

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**  
**DOTTORATO DI RICERCA IN**  
**SCIENZE CLINICHE E FARMACO-TOSSICOLOGICHE VETERINARIE**  
**XIX CICLO**  
**COORDINATORE: CHIAR.MO PROF. ANGELO PERSECHINO**  
**ANNO ACCADEMICO 2005/2006**

**TESI**  
**MARCATORI MOLECOLARI PER LO STUDIO DI ASPETTI**  
**IMMUNOLOGICI, DIAGNOSTICI E TERAPEUTICI DELLA**  
**LEISHMANIOSI CANINA**

**CANDIDATO:**

**Dr. Luigi Michele Pavone**

**DOCENTE GUIDA:**

**Chiar.mo Prof. Angelo Elio Gravino**

# **INDICE**

## **INTRODUZIONE**

<b>La leishmaniosi</b>	<b>p. 4</b>
<b>Distribuzione geografica</b>	<b>p. 8</b>
<b>Ciclo biologico della <i>Leishmania</i></b>	<b>p. 11</b>
<b>Leishmaniosi canina</b>	<b>p. 14</b>
<b>Immunologia</b>	<b>p. 18</b>
<b>Patogenesi</b>	<b>p. 25</b>
<b>Sintomatologia</b>	<b>p. 26</b>
<b>Diagnosi</b>	<b>p. 30</b>
<b>Terapia</b>	<b>p. 34</b>

<b>SCOPO DEL LAVORO DI TESI</b>	<b>p. 38</b>
---------------------------------	--------------

## **PROCEDURE SPERIMENTALI**

<b>Animali</b>	<b>p. 43</b>
<b>Campioni biologici</b>	<b>p. 43</b>
<b>Colture parassitarie</b>	<b>p. 44</b>
<b>Saggio di immunofluorescenza indiretta (IFAT)</b>	<b>p. 44</b>
<b>Diagnosi parassitologica</b>	<b>p. 45</b>
<b>Estrazione del DNA</b>	<b>p. 45</b>
<b>Amplificazione del DNA mediante PCR</b>	<b>p. 46</b>
<b>Estrazione dell'RNA e produzione di cDNA</b>	<b>p. 48</b>
<b>Sintesi dei primers e delle sonde</b>	<b>p. 48</b>
<b>Real-time PCR</b>	<b>p. 49</b>

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

**Standardizzazione della RT-PCR su tessuti di cute per la diagnosi e il follow-up della leishmaniosi nel cane** p. 52

**Standardizzazione della real-time PCR su campioni di urine per il trattamento clinico di cani leishmaniotici con coinvolgimento renale** p. 63

**Valutazione della quantità di DNA di *Leishmania* e dell'accumulo di mRNA di citochine nei tessuti di cani infetti asintomatici** p. 70

**CONCLUSIONI** p. 84

**BIBLIOGRAFIA** p. 86

## INTRODUZIONE

### La leishmaniosi

La leishmaniosi è una malattia parassitaria causata da membri del genere *Leishmania*, parassiti che infettano numerose specie animali, incluso l'uomo, e che sono trasmesse dalla puntura di un flebotomo (Desjeux 1992). Il parassita esiste in due forme morfologiche, una forma amastigote presente negli ospiti vertebrati (uomo, cani, gatti, ramarri, gerbilli, scoiattoli ed altri roditori) ed una forma promastigote ritrovata nei vettori flebotomi. Gli ospiti serbatoio della maggioranza delle specie di *Leishmania* dai quali i parassiti sono trasmessi agli uomini sono i roditori ed i canidi (leishmaniosi zoonotiche); solo in alcune specie la trasmissione avviene dall'uomo infetto a quelli non infetti (leishmaniosi antroponotica). Si conoscono oltre 20 specie di *Leishmania* trasmesse da circa 30 specie di flebotomi (Ashford 1997; Herwaldt 1999). Cinque specie maggiori di *Leishmania* (*L. tropica*, *L. major*, *L. donovani*, *L. braziliensis* e *L. mexicana*) causano le tre principali forme di malattia nell'uomo, la leishmaniosi cutanea, la leishmaniosi viscerale e la leishmaniosi mucocutanea. La forma e la severità della malattia dipendono in gran parte dalla specie di parassita infettante e dallo stato immunitario dell'ospite (Kane and Mosser 2000).

La leishmaniosi viscerale, nota come kala-azar in India, è la causa di molti decessi e malattie nei Paesi sottosviluppati. Essa rappresenta la forma più

grave di leishmaniosi ed è prevalentemente trasmessa dalla *L. donovani* in India e in Africa o dalla *L. infantum* nel bacino del Mediterraneo e dalla *L. chagasi* nel Nuovo Continente (Roberts and Janovy 1995; Herwaldt 1999; Guerin et al. 2002). L'uomo è l'unico serbatoio conosciuto della *L. donovani*, mentre i canidi, specialmente i cani domestici e randagi, rappresentano il serbatoio per la *L. infantum* e la *L. chagasi*.

I sintomi comprendono la comparsa di febbre, malessere generale, un progressivo deperimento associato ad anemia, protrusione dell'addome causata dalla splenomegalia e dall'epatomegalia. Si riscontra anche edema, specialmente della faccia, sanguinamento delle mucose, respirazione difficoltosa e diarrea. Senza trattamento, la malattia è fatale mediamente nel giro di 2-3 anni.

Le leishmaniosi cutanea e mucocutanea, seppure non fatali, causano deturpazioni, distruzione della bocca, del naso e delle orecchie e grave disabilità. La leishmaniosi cutanea è causata principalmente dalle *L. tropica*, *L. major* e *L. mexicana*, quella mucocutanea dalla *L. braziliensis*.

La nomenclatura delle specie di *Leishmania* che causano malattia nell'uomo non è ancora ben definita (Ashford 2000; Dedet and Pratlong 2002). Attualmente la specie *L. chagasi* del Nuovo Continente è considerata un sinonimo della *L. infantum*; altri autori considerano la *L. archibaldi* e la *L. killicki* come specie distinte dalle specie strettamente correlate *L. donovani* e *L. tropica*, rispettivamente. Infine, la tassonomia delle specie di *L.*

*colombiensis* del Nuovo Continente è ancora controversa (Mendoza-Leon et al. 2002). Tra le 15 specie riconosciute infettive per l'uomo, 13 hanno natura zoonotica (Tabella 1). Inoltre, per le uniche due specie che hanno una trasmissione esclusivamente antroponotica o predominante, come la *L. donovani* (e la *L. archibaldi*) e la *L. tropica* (e la *L. killicki*), è stata osservata la presenza di un ospite animale serbatoio in alcune zone endemiche, come il Sudan orientale per la *L. donovani* (Dereure et al. 2003), il Marocco, l'Israele settentrionale e l'Iran per la *L. tropica* (Dereure et al. 1991, Jacobson et al. 2003, Mohebbi et al. 2005). Infine, alcune specie di *Leishmania* sono state riscontrate in ospiti animali ma non nell'uomo, come la *L. gerbilli*, la *L. turanica* e la *L. arabica* in roditori del Vecchio Continente, la *L. equatoriensis* in mammiferi boschivi in Ecuador e la *Leishmania* sp. nel canguro rosso, *Macropus rufus*. (Ashford 2000; Grimaldi et al. 1992; Rose et al. 2004).

## Tabella 1

### *Specie di Leishmania che causano leishmaniosi zoonotica*

<b>Specie di <i>Leishmania</i></b>	<b>Malattia nell'uomo</b>	<b>Distribuzione geografica</b>	<b>Principali serbatoi</b>
<i>L. infantum</i> (sin. <i>L. chagasi</i> )	Leishmaniosi viscerale; Leishmaniosi cutanea localizzata	Bacino del Mediterraneo, Asia medio-orientale e centrale fino al Pakistan, Cina, America centrale e meridionale	Cane
<i>L. major</i>	Leishmaniosi cutanea localizzata	Nord Africa, Asia medio-orientale e centrale, Africa sub sahariana, savane	Roditori Gerbillidae, vari roditori
<i>L. aethiopica</i>	Leishmaniosi cutanea localizzata e diffusa	Etiopia, Kenia	Irace
<i>L. mexicana</i>	Leishmaniosi cutanea localizzata	America centrale	Roditori selvatici
<i>L. amazonensis</i> (sin. <i>L. ganhami</i> , <i>L. pifanoi</i> )	Leishmaniosi cutanea localizzata e diffusa	Sud-America, Amazzonia settentrionale	Roditori selvatici
<i>L. venezuelensis</i>	Leishmaniosi cutanea localizzata	Venezuela	Sconosciuto
<i>L. braziliensis</i>	Leishmaniosi cutanea localizzata, Leishmaniosi muco-cutanea	America centrale e meridionale, Messico	Numerosi mammiferi delle foreste pluviali
<i>L. guyanensis</i>	Leishmaniosi cutanea localizzata	Guyana, Brasile	Bradipi
<i>L. lainsoni</i>	Leishmaniosi cutanea localizzata	Brasile, Bolivia, Perù	Roditori
<i>L. naiffi</i>	Leishmaniosi cutanea localizzata	Brasile, Guyana francese, Ecuador, Perù	Armadilli
<i>L. panamensis</i>	Leishmaniosi cutanea localizzata, Leishmaniosi muco-cutanea	America centrale, Columbia, Ecuador	Bradipi
<i>L. peruviana</i>	Leishmaniosi cutanea localizzata	Ande peruviane	Cane
<i>L. shawi</i>	Leishmaniosi cutanea localizzata	Brasile	Mammiferi boschivi

da: Gramiccia and Gradoni, 2005, *Int J Parasitol* 35, 1169-1180

## **Distribuzione geografica**

Le leishmaniosi colpiscono 14 milioni di persone in circa 90 Paesi, da quelli a temperatura calda fino ai Paesi sub-tropicali e tropicali (Ashford et al. 1992). Il Sud-est asiatico e l’Australia sono le uniche grandi aree con climi idonei dove la malattia è assente (Figura 1).

La leishmaniosi viscerale è endemica in 62 paesi con un totale di 200 milioni di persone a rischio, 500.000 nuovi casi ogni anno nel mondo (Desjeux 1996) e 41.000 morti registrate nel 2000 (WHO 2001). Come per altre malattie tropicali, i dati epidemiologici sono incompleti e la reale prevalenza della malattia è probabilmente sottostimata (Thakur 2000). Inoltre, sia il numero di casi registrati che le aree geografiche interessate dalla malattia sono aumentate nelle ultime due decadi (Arias et al. 1996).

Più del 90% dei casi di leishmaniosi viscerale si riscontrano in cinque Paesi: India (specialmente nelle pianure del Gange e del Bramaputra), Bangladesh, Nepal, Sudan e Nord-est del Brasile (Desjeux 1996). Lo spostamento delle popolazioni come conseguenza delle guerre, della siccità, della carestia o la migrazione dalle campagne alla città è stato responsabile della più recente epidemia in Sudan che ha causato una mortalità di circa il 36 % della popolazione (Seaman et al. 1996), ha contribuito alla ricomparsa della malattia in India (Thakur 2000; Herwaldt 1999) e alla sua diffusione urbana in Brasile (Arias et al. 1996).



Ci sono circa 30-100 infezioni sub-cliniche per ogni caso manifesto di leishmaniosi viscerale. I fattori di rischio per lo sviluppo clinico della malattia comprendono la malnutrizione (Cerf et al. 1987), i farmaci immunosoppressori e specialmente la co-infezione con il virus HIV (Alvar et al. 1997; Berman 1997; Desjeux and Alvar 2003).

Sia la forma antroponotica che quella zoonotica della leishmaniosi cutanea si riscontrano in zone aride o semi-aride nel Vecchio Continente, come nelle città densamente popolate dell'Asia centrale e occidentale o in regioni rurali semi-desertiche dell'Asia e del Nord Africa dove si ritrovano serbatoi ospiti. Nel Nuovo Continente la leishmaniosi cutanea, trasmessa da *L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, è largamente diffusa in America centrale e meridionale e la sua distribuzione è legata alla presenza di vettori adatti e ospiti serbatoio (Ashford 2000).

## Figura 1

### *Distribuzione mondiale della leishmaniosi*



da: Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S, 2003, *BMJ* 326, 377-382

## **Ciclo biologico della *Leishmania***

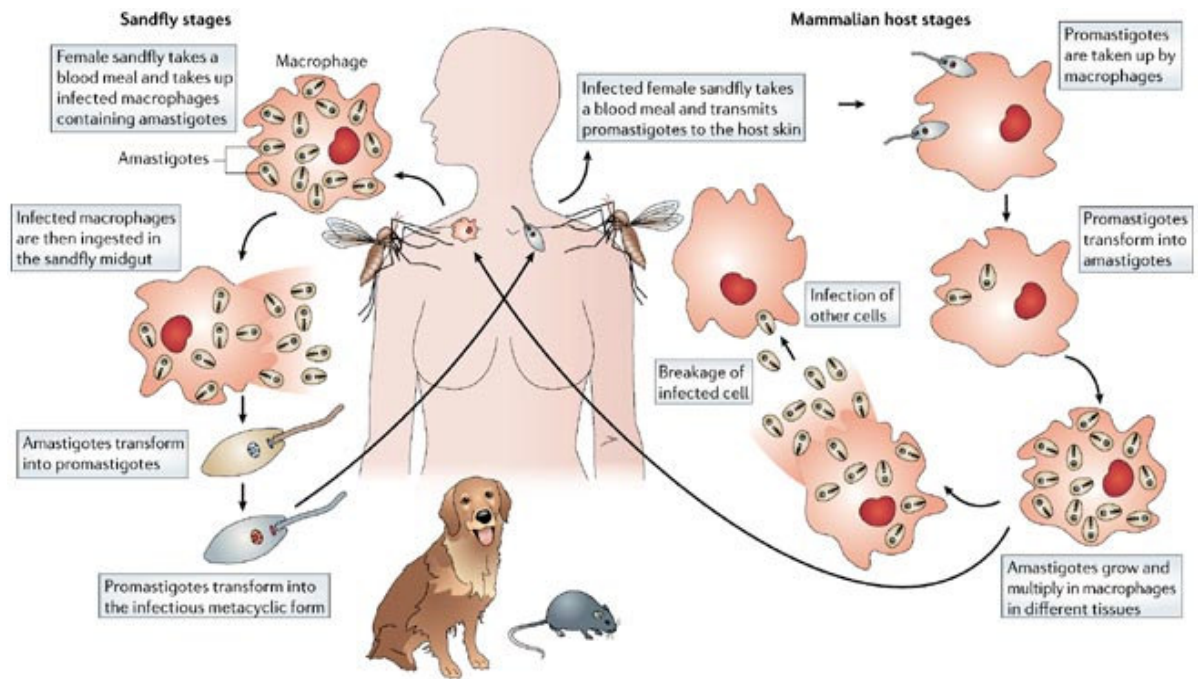
I parassiti di tutte le specie di *Leishmania* sono morfologicamente simili e si ritrovano nelle cellule reticolo-endoteliali di un vertebrato ospite e nell'intestino del flebotomo. Il ciclo vitale del parassita (Figura 2) consiste di due differenti stadi di sviluppo: l'amastigote ed il promastigote. Gli amastigoti sono forme intracellulari, arrotondate o fusiformi, non mobili, dalle dimensioni di 2-5 micron di diametro, contenenti un singolo nucleo, un kinetoplasto ed una tasca flagellare munita di un rudimentale flagello. Gli amastigoti sono presenti nei fagolisosomi di monociti e macrofagi degli ospiti vertebrati, dove si dividono ripetutamente per scissione binaria. Successivamente essi invadono le altre cellule macrofagiche in seguito a lisi della cellula ospite iniziale (Ashford 2000). L'amastigote si trasmette ad altri ospiti vertebrati mediante la puntura di flebotomi femmine ematofaghe del genere *Phlebotomus* (Vecchio Continente) e *Lutzomya* (Nuovo Continente).

L'insetto vettore ingerisce, attraverso il suo pasto di sangue, gli amastigoti contenuti nei macrofagi e nei monociti che sono, poi, rilasciati nell'intestino medio del flebotomo dove si differenziano in promastigoti prociclici, flagellati che aderendo all'epitelio dell'intestino medio continuano a proliferare rapidamente. Attraverso un processo detto di metaciclogenese, le forme procicliche, non infettive acquistano capacità virulenti e si trasformano nelle forme metacicliche infettive. I promastigoti metaciclici si staccano dall'epitelio dell'intestino medio e migrano nella faringe e nella cavità

buccale dell'insetto vettore. Durante il successivo pasto del flebotomo, i promastigoti metaciclici infettivi sono iniettati nell'ospite vertebrato dove devono evitare la loro distruzione da parte del sistema immunitario per poter invadere i macrofagi attraverso un meccanismo di fagocitosi mediato da un recettore. Successivamente i promastigoti sono incorporati nei fagolisosomi dove si differenziano nella forma amastigote. Gli amastigoti, proliferando, causano la distruzione dei macrofagi, sono rilasciati per infettare altri macrofagi vicini e il ciclo riprende nuovamente (Alexander et al 1999).

**Figura 2**

*Ciclo biologico della Leishmania*



da: Lipoldová M, Demant P, 2006. *Nat Rev Genet* 7, 294-305

## **Leishmaniosi canina**

La leishmaniosi canina è presente in circa 50 Paesi tra quelli dove si riscontra la leishmaniosi umana, ma è principalmente diffusa in tre aree più importanti: Cina, bacino del Mediterraneo e Brasile. L'esistenza della leishmaniosi canina è determinata da una serie di fattori epidemiologici che permettono un contatto molto intimo tra gli insetti vettori e l'ospite vertebrato, consentendo lo sviluppo del ciclo biologico della leishmaniosi.

I canidi soddisfano le condizioni necessarie per diventare serbatoi della *L. infantum*; molti lupi, volpi e sciacalli trasmettono il parassita costituendo il ciclo selvatico, ma a causa del loro basso numero e della lontananza dalle abitazioni essi non sono considerati serbatoi principali. Per la sua sinantropia con gli uomini, solo la volpe incrocia fra il ciclo selvatico e quello domestico che è mantenuto dai cani come ospiti serbatoio. La *L. infantum* è stata anche riscontrata nei ramarri, nelle galline, nei cavalli e nei gatti, che agiscono solo come ospiti paratenici senza alcun significato epidemiologico.

Il cane è il principale serbatoio della leishmaniosi viscerale, causata dalla *L. infantum* nel Vecchio Continente e dalla *L. chagasi* nel Nuovo Continente (WHO 1990). Casi sporadici in cani dovuti alla *L. arabica*, *L. tropica* e *L. major* sono stati riportati in Paesi del Mediterraneo meridionale (Peters et al. 1986; Dereure et al. 1991; Elbihari et al. 1987).

L'importanza del sesso, dell'età e della razza dell'ospite in relazione alla comparsa della malattia è stata studiata mediante indagini epidemiologiche. Il

Sesso non è un fattore determinante, anche se è stato riportato che i cani anziani maschi sono più frequentemente infettati (Fisa et al. 1999). La prevalenza della leishmaniosi per fasce di età ha una distribuzione bimodale con l'80% dei cani infetti al di sotto dei tre anni ed un altro picco, meno significativo, quando i cani vanno incontro a immunodepressione all'età di otto-dieci anni (Alvar et al. 2004). Tutte le razze canine sono suscettibili all'infezione, malgrado sia stato accertato che alcune razze, quali i cani da caccia Ibiza e i bastardi delle aree endemiche, abbiano sviluppato un certo livello di resistenza (Solano-Gallego et al. 2000). Sembra che i cani nati da accoppiamenti fra consanguinei siano più suscettibili. Alcune razze manifestano particolari quadri clinici, quali la dermatite nodulare nei boxers.

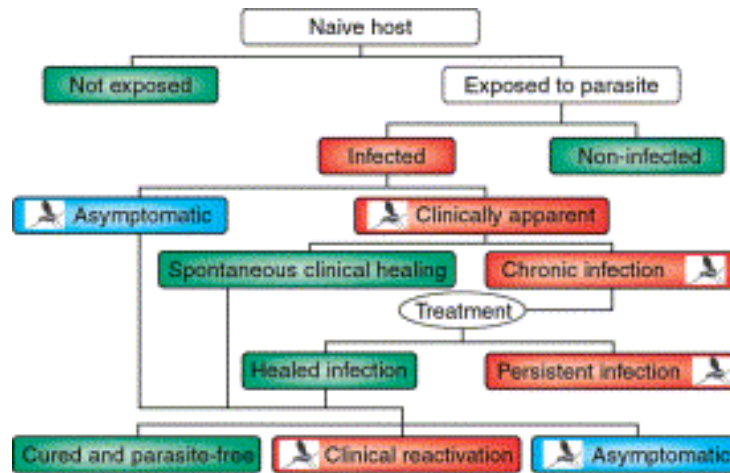
Un altro fattore determinante nella leishmaniosi canina è la molteplicità dei fattori di virulenza del parassita. La variabilità della *L. infantum* ed il suo effetto sull'epidemiologia è stata studiata mediante caratterizzazione isoenzimatica. Nei Paesi del Mediterraneo sono stati descritti 25 distinti zimodemi di *L. infantum* (Alvar 2001). E' stato osservato che due differenti zimodemi possono simultaneamente infettare lo stesso ospite umano o canino. Il più comune zimodemo ritrovato in circa 230 isolati di *L. infantum* nell'uomo è MON-1, responsabile del 90% dei casi di leishmaniosi viscerale e del 20% dei casi di leishmaniosi cutanea. Anche nei cani la maggioranza degli isolati erano MON-1 (Alvar 2001).

Studi recenti che hanno utilizzato tecnologie molecolari per determinare la prevalenza dell'infezione in cani provenienti da aree endemiche hanno dimostrato che la percentuale di cani infetti è molto più alta di quella degli animali che sviluppano la malattia (Berrahal et al. 1996; Sideris et al. 1999; Solano-Gallego et al. 2001). L'infezione di un cane da *L. infantum*, infatti, non necessariamente porta a malattia conclamata (Figura 3). Alcuni cani infetti possono controllare la propagazione del parassita e curare l'infezione; in altri l'infezione può rimanere sub-clinica per un tempo indefinito (anni o anche tutta la vita) durante il quale l'animale non presenta sintomi. Nei cani, invece, che non hanno la capacità di controllare il parassita, la malattia progredisce e dopo due-quattro mesi d'incubazione compaiono i sintomi della leishmaniosi (Fisa et al. 1999; Quinnell et al. 2001; Moreno and Alvar 2002). Tali differenze possono essere attribuite sia a fattori genetici che a stati immunologici.



**Figura 3**

*Storia naturale della leishmaniosi canina*



Differenti fenotipi di cani che possono comparire in seguito alla puntura di un flebotomo infetto da *Leishmania* sono indicati: cani sani non infetti (verde), cani asintomatici (blu), cani sintomatici (rosso). Il simbolo del flebotomo indica le situazioni nelle quali il cane infetto è capace di trasmettere il parassita all'insetto vettore, come dimostrato dalla xenodiagnosi.

da: Moreno J, Alvar J. *Trends Parasitol.* 2002, 18, 399-405

## Immunologia

L'attivazione dei macrofagi ad opera delle citochine prodotte dalle cellule T è necessaria per il controllo dell'infezione cellulare e per la progressione della malattia. In queste cellule, l'inibizione della crescita della *Leishmania* o la sua distruzione è mediata dalla produzione di ossido nitrico da parte della isoforma inducibile della ossido nitrico sintasi (iNOS). La trascrizione di questo enzima è aumentata dall'interferone (IFN)- $\gamma$ , una citochina chiave nel controllo della *Leishmania*, e da altre citochine sinergiche quali il fattore di necrosi tumorale (TNF)- $\alpha$  o l'interleuchina (IL)-2 (Ding et al. 1988; Belesovic et al. 1990). L'attivazione dei macrofagi è il risultato di un "network" di segnali di chemochine regolatrici che modulano la proliferazione delle cellule, l'attivazione e l'espansione.

La maggior parte degli studi sulla risposta immunitaria alla infezione da *Leishmania* sono stati condotti sul topo (Kramer et al. 2006). Il modello murino ha dimostrato che alcuni topi soccombono in seguito all'infezione, mentre altri eliminano il parassita e sopravvivono. Da tali studi è anche emersa una chiara dicotomia immunologica: la resistenza alla malattia è cellula-mediata (risposta Th1), mentre la progressione della malattia e la conseguente morte sono associate ad una forte risposta umorale (risposta Th2). Nei topi BALB/c, l'infezione con *L. major* provoca una malattia che progredisce con disseminazione viscerale, associata alla comparsa nei linfonodi di cellule parassita-specifiche del tipo Th2, quali ad esempio cellule

T effettrici CD4+ che rilasciano IL-4 dopo stimolazione. La maggior parte dei ceppi di topi (CBA, C3H, o C57BL/6) controllano facilmente l'infezione e sviluppano una forte risposta con la comparsa di cellule Th1, quali ad esempio le cellule T effettrici CD4+ che rilasciano IFN- $\gamma$ , ma non IL-4, e sono richieste per l'immunità fagocita-dipendente.

La problematica aperta è come si determini una risposta Th1 o Th2. Sebbene alcuni studi suggeriscano che alcuni antigeni della *Leishmania* potrebbero indirizzare ad una risposta Th1 o Th2 nei topi suscettibili, ci sono evidenze che le cellule T più primitive possono maturare in entrambi i sottogruppi di cellule effettrici e che le citochine prodotte al tempo dell'attivazione delle cellule T mediano la differenziazione (Seder and Paul 1994). IL-4 (e in minore misura IL-10) e IL-12 sembrano avere un ruolo principale nel mediare lo sviluppo di Th2 e Th1, rispettivamente, mentre la citochina Th1 IFN- $\gamma$  apparentemente non sembra alterare il corso dell'infezione nei topi suscettibili. La produzione precoce da parte dei macrofagi di IL-12 sopprime la trascrizione di IL-4, mentre attiva quella di IFN- $\gamma$  (Heinzel et al. 1993); la persistenza di IL-12 endogena è richiesta per sostenere un responso Th1 e il controllo a lungo termine dell'infezione (Stobie et al. 2000).

In generale, la risposta immunitaria nei topi in seguito all'infezione con le specie viscerotropiche di *Leishmania*, quali *L. donovani* o *L. infantum*, sono simili a quelle osservate nel modello murino di *L. major* (Gradoni 2001).

Numerose evidenze hanno dimostrato l'esistenza della dicotomia Th1/Th2 nella risposta mediata dalle cellule T anche nella leishmaniosi umana. L'esito dell'infezione appare determinato e regolato dal bilanciamento delle due popolazioni di cellule T parassita-specifiche (Kemp et al. 1996).

A differenza della elevata quantità di dati sperimentali sul modello murino di *Leishmania* e, seppure in minore estensione, sulla leishmaniosi umana, molto limitata è la conoscenza dei meccanismi coinvolti nella risposta immunitaria alla *Leishmania* nel cane. Ciò è dovuto essenzialmente alla mancanza di prodotti commerciali standardizzati per la caratterizzazione delle popolazioni cellulari immunocompetenti canine e delle chemochine. Solo recentemente si sono rese disponibili nelle banche dati genomiche le sequenze del DNA di importanti citochine canine.

Una naturale e sperimentale resistenza all'infezione alla *Leishmania* nel cane è stata riportata da molto tempo (Lanotte et al. 1979). Clinicamente, tre categorie di cani infetti asintomatici possono essere identificate: quelli che progrediscono verso la malattia manifesta, quelli che restano asintomatici per periodi prolungati (anche per tutta la vita) e quelli che guariscono spontaneamente. I cani appartenenti alle ultime due categorie sono considerati resistenti, mentre quelli che evolvono clinicamente verso la malattia vengono definiti suscettibili (Gradoni 2001). Studi condotti in aree endemiche hanno mostrato che il rapporto tra le categorie di cani asintomatici è di 1:1:1 (Pozio et al. 1981), ma tale risultato potrebbe essere conseguenza

dei metodi usati per accertare l'infezione da *Leishmania* (Gradoni 1999). Immunologicamente tale ampio spettro è stato confermato da analisi sierologiche e delle cellule mononucleari del sangue periferico (PBMCs) di una larga popolazione di cani asintomatici che vivono in una zona endemica del Portogallo (Cabral et al. 1998). I risultati hanno mostrato che gli animali potrebbero essere ugualmente suddivisi in soggetti che hanno un responso anticorpale negativo, ma un responso positivo proliferativo delle cellule T all'antigene *Leishmania* (resistenti?) oppure anticorpi positivi ma negativi per le cellule T (suscettibili?) oppure positivi per entrambi anticorpi e cellule T. La genetica del cane sembra che abbia influenza nel determinare la resistenza alla malattia; per esempio, fra i cani da caccia Ibizan, la prevalenza dei casi di malattia clinica manifesta è molto più bassa che in altre razze, e tale caratteristica è stata associata ad una significativa reattività delle cellule immunitarie come indicato dall'elevato tasso di risposta positiva al "leishmanin skin test" LST (Solano-Gallego et al. 2000).

Tentativi di caratterizzare la risposta immunitaria cellulare nei cani asintomatici in confronto a quella dei cani sintomatici affetti da leishmaniosi sono stati effettuati da vari autori (Pinelli et al. 1994; Martinez-Moreno et al. 1995). Cellule PBMC da animali infetti sia naturalmente che sperimentalmente, con diversi gradi di manifestazione clinica della malattia, sono stati esaminati per la risposta linfoproliferativa a stimolante e antigene della *Leishmania* e per la produzione di alcune citochine. In generale, i

linfociti dei cani resistenti rispondevano maggiormente all'antigene e producevano più alti livelli di IL-2 e TNF che non le cellule da cani non infetti o da cani sintomatici. Inoltre, bassi o non misurabili livelli di anticorpi correlavano con una significativa risposta all'LST nei cani asintomatici, in contrasto agli alti titoli anticorpali e bassi responsi all'LST osservati nei cani sintomatici. Nella Figura 4 sono riportati i principali meccanismi cellulari coinvolti nella resistenza o nella progressione della leishmaniosi viscerale canina.

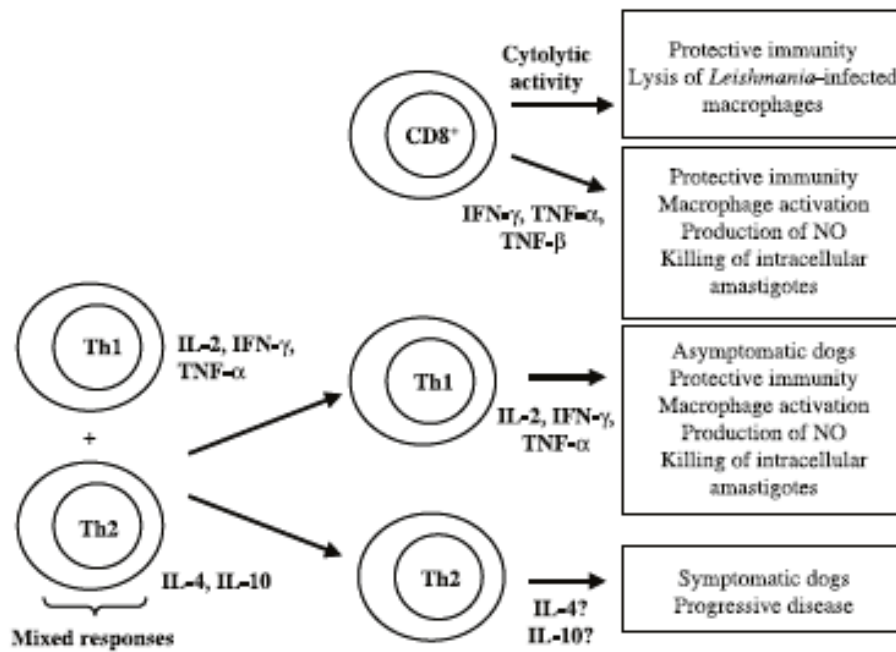
Profili differenti delle sottoclassi di IgG1 e IgG2 sono stati proposti quali indicatori della dicotomia della risposta anticorpale all'infezione da *Leishmania*, con le IgG2 associate alla condizione asintomatica, e le IgG1 alla malattia (Deplazes et al. 1995). Tale osservazione, tuttavia, non è stata confermata da altri studi (Bourdoiseau et al. 1997; Solano-Gallego et al. 2000).

Da quanto su detto risulta evidente che il principale requisito per un vaccino anti-*Leishmania* è l'induzione di una risposta cellulare di tipo Th1 a lungo termine. La predisposizione delle cellule T a svilupparsi nel tipo Th1 o Th2 può dipendere da molteplici fattori, quali la genetica dell'ospite, l'ambiente e la natura delle citochine, e la dose dell'antigene leishmaniale (Barbieri 2006). Tra questi fattori, la stimolazione precoce della produzione endogena di IL-2 sembra giocare un ruolo centrale nella conseguente induzione, estensione e memoria di una risposta Th1 (Stobie et al. 2000).

Sono, tuttavia, ancora oggi oggetto di studio la risposta immunitaria alla *Leishmania* nel cane, il sistema immunitario canino, la comprensione dei fattori critici per lo sviluppo di efficienti strategie d'immunizzazione.

**Figura 4**

*Rappresentazione schematica della regolazione immunitaria di tipo Th e delle cellule citotossiche T nella leishmaniosi viscerale canina*



da: Barbieri CL, 2006. *Parasite Immunol* 28, 329–337



## Patogenesi

Nella leishmaniosi viscerale canina, la distribuzione del parassita è estesa a tutto l'organismo (milza, fegato, linfonodi, midollo osseo, rene, cute, ecc) contrariamente a quanto avviene nell'uomo in cui il parassita è normalmente localizzato nel fegato, nella milza e nel midollo osseo. In seguito alla puntura del flebotomo, i parassiti si diffondono rapidamente ai linfonodi e alla milza attraverso il sistema circolatorio ematico e linfatico e successivamente invadono il rene ed il fegato. In un secondo momento, i parassiti diffondono negli organi riproduttori, nella cute, nella vescica, nel tratto digestivo, nei polmoni, ecc. La presenza della *Leishmania* nei vari tessuti ed organi provoca reazioni che producono le lesioni ed i sintomi caratteristici dell'infezione. Si produce anche una risposta umorale che comincia con la stimolazione delle cellule B che producono un'alta concentrazione di  $\gamma$ -globuline, comprendenti immunoglobuline specifiche e non specifiche (Persechini and Oliva 1986). Inoltre si formano immunocomplessi, costituiti principalmente da IgG e le frazioni C1, C2 e C4 del complemento (Lucena et al. 1994).

Si osservano comunemente lesioni cutanee che differiscono a seconda della risposta immunitaria dell'ospite, quali dermatiti nel caso di resistenza alla malattia e ulcere nei casi suscettibili (Hervàs Rodriguez et al. 1996; Fondevila et al. 1997). Nei reni le lesioni sono caratterizzate da danni tubulari e glomerulari conseguenti alla risposta immunitaria. La comparsa di glomerulonefriti acute ed extramembranose che causano insufficienza renale

è dovuta alla precipitazione di immunocomplessi formati da IgG anti-*Leishmania* (Lopez et al. 1996; Costa et al. 2000).

L'infezione parassitaria induce alterazioni morfologiche del fegato con la formazione di infiltrazioni infiammatorie, granulomi, iperplasia ed ipertrofia delle cellule Kupffer che provocano alterazioni del metabolismo epatico (Vianna et al. 2002).

Oltre a questi organi il parassita provoca alterazioni alla milza e alle mucose e lesioni alla lingua, ai genitali e alla cavità orale (Font et al. 1996). Gli amastigoti producono anche lesioni vascolari alle arteriole di numerosi organi, quali occhi, polmoni, tratto intestinale, tessuto muscolare, ecc. (Pumarola et al. 1991). Meningiti causate da *L. infantum* sono state descritte con la presenza di anticorpi anti-*Leishmania* nel liquido cerebrospinale (Vinuelas et al. 2001).

## **Sintomatologia**

I sintomi clinici ed il periodo della comparsa della malattia sono molto variabili, estendendosi dalla totale assenza di sintomi a forme cliniche molto gravi. Il periodo dell'incubazione dell'infezione varia da 2 a 8 mesi dalla puntura del flebotomo (Gaeta et al. 1994). Alcuni autori, tuttavia, riportano che il periodo d'incubazione si può estendere a 15 mesi (Rioux et al. 1979).

La sintomatologia della leishmaniosi canina è alquanto polimorfa (Tabella 3); nella maggior parte dei casi la patologia assume un andamento subacuto o cronico. Raramente è possibile osservare una fase acuta con la comparsa di febbre a differenza di quanto avviene nell'uomo. Le forme cliniche possono essere asintomatiche, oligosintomatiche e polisintomatiche.

Pochi sono gli studi relativi ai sintomi precoci della malattia. Tali studi, effettuati solo con infezioni sperimentali, mostrano notevoli differenze non solo nei sintomi clinici precoci, ma anche nel periodo di latenza e nell'evoluzione della malattia (Alvar et al. 2004). In questa fase si può osservare un lento ma progressivo dimagrimento, una lieve o marcata disoressia, astenia e facile affaticamento, accompagnate da lesioni cutanee (periorbitali e auricolari), leggera sintomatologia cardiaca e sofferenza alla palpazione renale. Alcuni autori riportano sintomi emorragici tra i primi segni clinici della malattia (Corlouer et al. 1983).

Durante il periodo di malattia conclamata, la leishmaniosi canina presenta una molteplicità di sintomi. La maggior parte di cani infetti mostra sintomi caratteristici della malattia, benchè in altri cani essi siano assenti. Sintomi non specifici sono l'ipertermia, l'apatia, l'astenia, l'alterazione dell'appetito, la polidipsia, la perdita di peso, ecc. Tra i sintomi più caratteristici di questa fase sono la linfoadenopatia, l'epatomegalia e la splenomegalia. Si osservano, anche, vari tipi di lesioni cutanee che vanno da una abbondante desquamazione, seborrea, fino alla comparsa di ulcere. Tali lesioni che

compaiono inizialmente intorno al naso, alle orbite oculari e alle orecchie si estendono successivamente a tutto il corpo. La sintomatologia cutanea nel cane è differente da quella nell'uomo in cui si osservano infiammazioni localizzate.

Sono frequenti, inoltre, sintomi oculari, quali congiuntiviti mucose o mucopurulenti e cheratiti ulcerative. Altre manifestazioni cliniche includono secrezioni nasali mucopurulente, epistassi, atrofia muscolare, onicogrifosi, tremori, deficit motorio, artriti, zoppia, osteomieliti ed artrosinoviti.

Nella fase finale della malattia, che può variare da due o tre mesi fino ad anni dopo l'infezione, si osserva un coinvolgimento della maggior parte degli organi e la presenza di ulcere estese. I cani, infine, diventano cachettici e la morte sopraggiunge in seguito ad insufficienza renale o epatica. In questa fase, possono comparire anche infezioni opportunistiche.

### Tabella 3

#### *Frequenza di sintomi in 93 cani con leishmaniosi clinica*

<i>Sintomi</i>	<i>No. di cani</i>	<i>Percentuale</i>
Linfoadenopatia	86	93.5
Onicogrifosi	69	75.0
Lesioni cutanee	54	58.7
Perdita di peso	24	26.1
Cachessia	22	23.9
Zoppia	21	22.8
Sonnolenza	20	21.7
Congiuntivite	17	18.5
Anoressia	15	16.3
Polidipsia	12	13.0
Polifagia	12	13.0
Onicorressia	10	10.9
Epistassi	8	8.7
Diarrea	6	6.5
Vomito	2	2.2
Tosse	1	1.1

da: Semiao-Santos et al, 1995. *Parasitol Res* 81, 235–239

## Diagnosi

La diagnosi di leishmaniosi canina non differisce molto da quella nell'uomo. Le metodologie di diagnosi comprendono l'isolamento del parassita (sia diretto che indiretto) e metodi immunodiagnostici che evidenziano la risposta cellulare e umorale (Tabella 2).

La diagnosi definitiva è effettuata mediante osservazione diretta del parassita su strisci colorati o dopo la coltura di campioni ottenuti principalmente dai linfonodi poplitei o dal midollo osseo. I campioni sono usati sia per la preparazione di vetrini colorati convenzionalmente con Giemsa's o altri coloranti per la rilevazione degli amastigoti, sia per la coltura in mezzo Novy-McNeal-Nicolle. Nelle colture positive i promastigoti si evidenziano a partire da una settimana, sebbene subcolture settimanali in mezzo fresco possano essere necessarie per visualizzare i parassiti. Le colture sono ritenute negative dopo quattro successive subcolture negative. L'osservazione al microscopio di uno striscio di midollo osseo è più sensibile dell'esame di un linfonodo (60-75% contro 40-50%), ma dipende dalla quantità di parassita che è associata alla gravità dell'infezione. Malgrado, tuttavia, l'elevata sensibilità del metodo, raramente esso viene utilizzato per una prima diagnosi, sia per la difficoltà di adattamento di un singolo isolato al mezzo, sia per il tempo lungo richiesto per ottenere il risultato, sia per la frequenza di contaminazioni. Inoltre, i campioni di midollo o linfonodi si ottengono con procedure invasive e non sono, pertanto, adatti a evidenziare il

parassita nei cani asintomatici. Si potrebbe usare una biopsia cutanea, ma l'evidenziazione degli amastigoti non è semplice a causa dell'elevato numero di cellule infiammatorie al sito della lesione ed, inoltre, se si tenta la coltura, le contaminazioni sono molto frequenti. Tale metodologia è, tuttavia, richiesta in studi epidemiologici in cui l'identificazione biochimica richiede l'isolamento del parassita.

La xenodiagnosi è poco usata per la diagnosi di leishmaniosi canina e deve essere effettuata in laboratori specializzati dal momento che necessita di una colonia ben stabilizzata di flebotomi. Nondimeno essa rappresenta un utile strumento epidemiologico per studiare la storia naturale della leishmaniosi canina (Alvar et al. 1994, Molina et al. 1994).

Una molteplicità di metodi indiretti sono stati sviluppati, principalmente colorazioni immunoistochimiche come immunoperossidasi o immunofluorescenza indiretta dei tessuti, che mettono in risalto gli amastigoti dallo sfondo attraverso una specifica colorazione del parassita. La tecnica che, tuttavia, ha avuto il maggiore successo dovuto all'elevatissima sensibilità e specificità è la "polymerase chain reaction" (PCR) con tutte le sue varianti. La PCR può essere effettuata sul DNA genomico o del kinetoplasto del parassita nel sangue, cute, linfonodi, congiuntiva o midollo osseo dei cani infetti. La sensibilità e specificità della PCR dipendono da una serie di fattori che comprendono i primers, il numero di copie del bersaglio, il metodo di estrazione del DNA e il protocollo per la PCR. La PCR negli

ultimi anni ha consentito un notevole progresso nella diagnosi di leishmaniosi canina, mostrando una sensibilità tra l'89 e il 100% nei casi sintomatici o confermati parassitologicamente (Ashford et al. 1995; Mathis and Deplazes 1995; Berrahal et al. 1996; Reale et al. 1999; Roura et al. 1999; Reithinger et al. 2000; Fisa et al. 2001; Silva et al. 2001; Solano-Gallego et al. 2001; Reithinger et al. 2002; Lachaud et al. 2002).

Le metodologie immunodiagnostiche comprendono saggi di immunità cellulare (skin test alla leishmanina) e di immunità umorale che includono saggi di agglutinazione (DAT), il saggio di immunofluorescenza indiretta (IFAT), saggi ELISA e dot-ELISA, e Western blotting.

Lo skin test alla leishmanina, detto anche saggio Montenegro o della ipersensibilità ritardata (DHT) è positivo nei cani infetti ma richiede l'inoculo di  $3 \times 10^5$  promastigoti fenolizzati contro i  $10^4$  utilizzati sull'uomo. La specifica risposta umorale presente nella leishmaniosi canina è molto intensa con alti livelli di IgG anti-*Leishmania* rendendo, pertanto, la diagnosi sierologica molto usata. Le metodologie sierologiche (IFAT, ELISA, tests di agglutinazione, etc.) utilizzano come antigene il parassita intatto o estratti solubili di esso. Il saggio IFAT è considerato il più attendibile ed è molto usato nella pratica veterinaria. Esso, tuttavia, pur essendo molto utile dal punto di vista clinico, talora sottostima l'incidenza dell'infezione nelle popolazioni di cani che vivono nelle aree endemiche.



## Tabella 2

### *Metodi diagnostici della leishmaniosi canina*

---

#### **Rivelazione del parassita**

##### *Metodi diretti*

- Osservazione al microscopio (colorazione di Giemsa)
- Coltura in mezzo specifico
- Inoculazione sperimentale in animali suscettibili
- Xenodiagnosi

##### *Metodi indiretti*

- Tecniche immunoistochimiche (immunoperossidasi, anticorpi monoclonali, ecc.)
- Ibridazione con sonde a DNA
- Reazione a catena della polimerasi (PCR)

#### **Immunodiagnosi**

- Immunità cellulare (skin test alla leishmanina)

##### Immunità umorale

- Immunodiffusione
- Controimmunolettroforesi
- Tecniche di agglutinazione (emoagglutinazione indiretta, test di agglutinazione in latex, test di agglutinazione diretta)
- Test indiretto con anticorpi immunofluorescenti
- ELISA, dot-ELISA, ELISA con antigeni ricombinanti
- Western blot
- Tests immunocromatografici

---

## **Terapia**

Il trattamento della leishmaniosi canina deve essere intrapreso solo dopo aver confermato la diagnosi sicura (identificazione degli amastigoti nel materiale biotico o nell'aspirato del midollo osseo o linfonodale) oppure se la sierologia è chiaramente positiva in presenza di segni clinici compatibili con la malattia anche senza la dimostrazione di parassiti nei campioni biologici. Prima di cominciare la terapia è consigliabile controllare lo stato generale di salute del cane, la temperatura, il peso, la grandezza della milza, la presenza di sintomatologia, i dati di laboratorio, le proteine totali e la funzione epatica e renale. Inoltre, durante il trattamento, si devono monitorare le funzioni epatica, cardiaca e renale.

La risposta al trattamento è di solito veloce: in pochi giorni la febbre scompare, il peso corporeo aumenta, l'aumento di volume degli organi interni e le lesioni cutanee si riducono, il quadro laboratoristico rientra nella normalità e si osserva un generale miglioramento delle condizioni del cane. Successivamente alla terapia, bisogna eseguire gli esami biochimici, clinici e parassitologici ed i cani trattati vanno seguiti periodicamente per monitorare le eventuali ricadute.

La terapia della leishmaniosi canina utilizza gli stessi farmaci che vengono adoperati per la leishmaniosi umana, sebbene i metodi di somministrazione ed i dosaggi differiscono. I farmaci di prima scelta sono i composti antimoniali pentavalenti. Attualmente, le due formulazioni

commerciali maggiormente utilizzate sono la meglumina antimonio ed il sodio stibogluconato. Non è ben conosciuto il meccanismo d'azione di tali composti, ma si ritiene che essi agiscano sul metabolismo energetico e che blocchino principalmente la produzione di ATP e GTP (Berman et al. 1987). I protocolli di somministrazione degli antimoniali sono vari. Normalmente si eseguono cicli di 30 giorni di trattamento seguiti da 7-10 giorni di riposo. La più comune via di somministrazione è intramuscolare, seguita da quella intravenosa (Ferrer et al. 1995; Slappendel and Teske 1997). Anche la via sottocutanea si è dimostrata efficace (Valladares et al. 1996). Nonostante l'alta tossicità attribuita agli antimoniali fin dall'inizio del loro uso nella terapia della leishmaniosi, tali farmaci sono correntemente considerati a bassa tossicità, perché i loro effetti contrari sono normalmente reversibili e solo in rare occasioni causano la necessità di interruzione del trattamento. Inoltre, poiché la *Leishmania* può causare danno epatico e renale, risulta difficoltoso determinare se tali alterazioni sono dovute alla chemioterapia o al parassita. All'inizio del trattamento può comparire un malessere generale del cane, con un abbassamento dei livelli anticorpali causato dal rilascio massivo di antigene in seguito alla morte degli amastigoti (Denerolle 1996). Una grande percentuale di cani recidivano in un periodo che varia da caso a caso a dimostrazione dell'impossibilità di ottenere la sterilizzazione parassitologica (Slappendel and Teske 1997), mentre alcuni cani restano in buone condizioni cliniche fino a oltre 5 anni dopo l'ultimo trattamento.

L'amfotericina B è considerata un farmaco di seconda scelta nel trattamento della leishmaniosi canina. Il meccanismo d'azione di tale farmaco si basa sulla sua unione all'ergosterolo nella membrana cellulare della *Leishmania* e al colesterolo nelle membrane delle cellule di mammifero (Brajtburg et al. 1990). Questa interazione causa una disorganizzazione strutturale della membrana con conseguente formazione di pori che permettono la perdita di costituenti cellulari e la morte dei parassiti per lisi osmotica. Sono stati descritti differenti protocolli terapeutici con amfotericina B desossicolato nel cane, ma sono meno variabili rispetto a quelli con gli antimoniali. La dose raccomandata varia da 0.1 a 1mg/kg/die somministrata mediante lenta infusione intravenosa. Gli effetti secondari associati all'uso dell'amfotericina B sono classificati in due gruppi: quelli legati all'infusione dell'antibiotico e quelli correlati alla dose e alla durata del trattamento. Gli effetti del primo gruppo dipendono dalla velocità dell'infusione e sembrano essere mediati dal rilascio di prostaglandine e di TNF. Il più importante effetto secondario dell'amfotericina B è la nefrotossicità, ma anche anomalie della funzione epatica possono comparire in seguito a terapia con tale farmaco. Lo sviluppo di formulazioni lipidiche per diminuirne la tossicità (Hiemenz and Walsh 1996) ha offerto la possibilità di una maggiore sicurezza quando la dose totale di amfotericina B somministrata è alta, benché l'alto costo di queste formulazioni rappresenti un fattore limitante per un uso veterinario in larga scala.

Altri trattamenti prevedono l'impiego di paromomicina (aminosidina), somministrata i.v. o i.m. o talora per via topica, di pentamidina per via i.v. e miltefosina, un alchil fosfolipide originariamente usato per via orale come agente antineoplastico nell'uomo. Malgrado il meccanismo di azione di tali farmaci non sia completamente noto, sembra che la paromomicina agisca sui ribosomi, bloccando la sintesi proteica (Neal et al. 1994), la pentamidina agisca sui mitocondri, inducendo la distruzione del DNA kinetoplasto e la riduzione del numero dei ribosomi (Alvar et al. 2004), la miltefosina agisca sulla sintesi dei fosfolipidi, causando alterazioni a livello della membrana del parassita.

Un trattamento molto utilizzato per la cura della leishmaniosi canina prevede l'impiego in combinazione con gli antimoniali dell'allopurinolo, un inibitore della xantina ossidasi essendo strutturalmente simile all'ipoxantina. Esso agisce come un "falso" nucleotide che viene incorporato nel DNA del parassita, modificandone la struttura ed inibendo, quindi, la sintesi delle proteine nel parassita.

Infine, è stato recentemente introdotto nella terapia della leishmaniosi canina l'uso di immunomodulatori, quali prednisone e prednisolone. Tale trattamento, tuttavia, è raccomandato solo quando sono presenti lesioni dovute alla deposizione di immunocomplessi.

## SCOPO DEL LAVORO DI TESI

Le metodologie comunemente usate per la diagnosi di leishmaniosi canina sono rappresentate dai tests sierologici. Essi, però, presentano i seguenti problemi: a) la sierologia può dar luogo a cross-reazioni non specifiche (Vexenat et al. 1996); b) ci possono essere ritardi fra l'infezione e la sieroconversione, ed una frazione di cani infetti potrebbe anche mai sieroconvertire (per esempio, in seguito ad un'innata resistenza) (Dye et al. 1993); c) la sieroconversione potrebbe non essere permanente (per esempio, in seguito allo sviluppo di un responso umorale o immuno cellula-mediato) (Quinnel et al. 2001). La specificità e la sensibilità, pertanto, dei tests sierologici può variare notevolmente e può sottostimare l'incidenza della malattia. L'esame microscopico di biopsie di cute o di lesioni, sebbene rapido e a basso costo, ha sensibilità limitata, specialmente nelle lesioni croniche. Le tecniche di coltura *in vitro* sono leggermente più sensibili dell'esame microscopico di vetrini di biopsie di lesioni o di campioni istologici; esse, tuttavia sono laboriose, costose e sono suscettibili di contaminazioni microbiologiche.

I metodi basati sulla PCR forniscono il miglior livello per determinare la presenza e l'identità della *Leishmania* non solo nei casi attivi, ma anche per monitorare la terapia dei pazienti dopo la chemioterapia e come strumento per uno "screening" di massa per evidenziare le infezioni da *Leishmania* nei

vertebrati ospiti o nei flebotomi vettori (Singh 1997). Sono stati messi a punto differenti tipi di estrazione del DNA dai tessuti (Reithinger et al. 2003; Muller et al. 2003), sono stati utilizzati differenti tipi di coppie di “primers” (Lachaud et al. 2002), differenti kinetoplasti (DNA mitocondriale) quali bersagli, e sono stati comparati diverse frazioni di campioni di sangue (sangue intero, leucociti, “buffy coat”) (Lachaud et al. 2002). Sono stati effettuati studi comparativi sull’impiego di sangue, aspirati di midollo osseo e linfonodi per l’analisi PCR, mentre pochi sono stati gli studi relativi all’impiego della cute nelle procedure PCR usate per la diagnosi di leishmaniosi canina (Ikonomopoulos et al. 2003; Solano-Gallego et al. 2004).

Il primo obiettivo di questo lavoro di tesi è stato, pertanto, quello di comparare la sensibilità e l’attendibilità dell’analisi PCR della cute con quella di altri tipi di campioni biologici (linfonodo e sangue) e con il classico saggio IFAT per la diagnosi e il follow-up di cani infetti.

I protocolli classici previsti per l’analisi PCR, tuttavia, non consentono un’analisi quantitativa della quota di parassiti presente in un campione clinico. Un approccio più recente prevede l’impiego della real-time PCR quantitativa per misurare la quota di DNA di *Leishmania* presente nei tessuti di animali infetti (Bretagne et al. 2001, Nicolas et al. 2002). Sono state messe a punto diverse metodologie real-time PCR che consentono di rilevare, quantificare e/o differenziare gli organismi di *Leishmania* (Schulz et al. 2003; Mary et al. 2004; Rolao et al. 2004; Wortmann et al. 2005; Francino et al.

2006). L'utilità della real-time PCR per il trattamento clinico di pazienti affetti dal virus immunodeficienti è stata stabilita definitivamente in medicina umana (Bossolasco et al. 2003). Il saggio della real-time PCR è basato sulla chimica TaqMan che permette la quantificazione sensibile e riproducibile in un ampio intervallo di numero di parassiti (Mary et al. 2004; Vitale et al. 2004; Francino et al. 2006). L'alta sensibilità è dovuta almeno in parte all'elevato numero di copie del kinetoplasto DNA bersaglio che è presente in circa 10.000 copie per parassita.

Il secondo obiettivo di questa tesi è stato quello di mettere a punto una procedura di real-time PCR semplice per la diagnosi e il follow-up di cani infetti sia asintomatici che sintomatici. Allo scopo ulteriore di stabilire il miglior tipo di campionamento non invasivo e semplice da effettuarsi, è stata messa a punto e standardizzata una metodica real-time PCR per la valutazione della quota di parassiti presenti nelle urine di cani infetti. La quota di parassiti presenti nelle urine è stata correlata a quella presente nel sangue e nel linfonodo, allo stato clinico e ai valori dei parametri clinici e laboratoristici.

Numerose evidenze mostrano che la prevalenza e l'incidenza della leishmaniosi canina sono sottostimate (Dye et al. 1992, Solano-Gallego et al. 2001, Alvar et al. 2004). Dopo l'infezione alcuni cani riescono a controllare il parassita e a non sviluppare la malattia a breve termine, qualche volta per anni o per l'intera vita, mentre altri cani infetti sviluppano la malattia



(Moreno and Alvar 2002). La presenza dell'infezione latente nei cani, anche per tutta la vita, è tipica e contribuisce al mantenimento della presenza del parassita a lungo termine nelle regioni endemiche. Il controllo della malattia rappresenta un serio problema dal momento che sia i cani sintomatici che quelli asintomatici sono infettivi per le zanzare vettori (Gradoni et al. 1987; Molina et al. 1994), e i farmaci anti-*Leishmania* hanno efficacia limitata (Herwaldt 1999; Gradoni 2001).

I dati attualmente disponibili per la leishmaniosi canina non consentono di predire l'evoluzione della malattia nei cani infetti asintomatici. La manifestazione clinica e l'evoluzione della malattia dipendono da complesse interazioni fra il parassita e la risposta immunitaria dell'ospite. La risoluzione dell'infezione dipende dall'abilità dei macrofagi di distruggere efficacemente il parassita. Questa attività è determinata dal bilancio tra un set eterogeneo di citochine (Rhalem et al. 1999). Precedenti studi su cani sperimentalmente infetti ha rivelato che i linfociti T e le citochine giocano un ruolo cruciale nel determinare se l'infezione evolve verso uno stato di immunità protettiva o una progressiva e manifesta malattia (Pinelli et al. 1994; Pinelli et al. 1995). Nel modello murino della leishmaniosi un responso Th1 conferisce protezione, mentre un responso Th2 rende l'ospite suscettibile all'infezione (Reiner and Locksley 1995; Fowell et al. 1998; Rogers et al. 2002; Sacks and Noben-Trauth 2002; Gummy et al. 2004). Studi sulla risposta immunitaria di cani sperimentalmente infetti hanno mostrato che l'immunità protettiva è

associata con la produzione di IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  da parte delle cellule mononucleari del sangue periferico (PBMC) in aggiunta all'induzione di cellule T parassita-specifiche (Moreno and Alvar 2002). L'attivazione dei macrofagi da parte dell'IFN- $\gamma$  risulta nella produzione di ossido nitrico che media la distruzione dei parassiti intracellulari (Pinelli et al. 1999; Gradoni and Ascenzi 2004). D'altra parte lo sviluppo della malattia è associato alla produzione di altri tipi di citochine quali IL-10, IL-12 e IL-18.

Negli anni recenti la PCR convenzionale è stata usata per analizzare il profilo della risposta immunitaria sia nell'uomo che nei cani infetti (Pinelli et al. 1999a; Santos-Gomes et al. 2002; Brachelente et al. 2005; Chamizo et al. 2005; Poot et al. 2005). Il terzo obiettivo di questo studio ha compreso l'impiego della real-time PCR per misurare sia la quota di *Leishmania* in differenti tessuti sia i livelli di espressione di alcune citochine relative ai pattern Th1 e Th2 nel sangue di due gruppi di cani infetti asintomatici. Un gruppo di cani comprendeva cani asintomatici che sono rimasti tali per tutto il periodo dello studio (2 anni); il secondo gruppo di cani comprendeva, invece, cani in cui la malattia si manifestava. La quota di DNA di *Leishmania* nei diversi tessuti e i livelli di espressione delle citochine sono stati misurati anche in un gruppo di cani infetti sintomatici (malati) e in un gruppo di cani sani allo scopo di trovare una possibile connessione fra la quantità di parassiti presenti nei vari tessuti, l'accumulo di mRNA di alcune citochine e la progressione clinica della malattia.

## **PROCEDURE SPERIMENTALI**

### **Animali**

I soggetti analizzati in questo studio sono rappresentati da cani sottoposti a visita ambulatoriale presso il Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie dell'Università degli Studi di Napoli Federico II. I cani di ambo i sessi, di razze diverse e di età compresa tra 1 e 10 anni vivono nel Sud Italia e sono infetti da *L. infantum* attraverso la puntura del flebotomo. Come controlli negativi sono stati selezionati cani sani che vivono in una regione d'Italia (Abruzzo) dove la malattia non è endemica. Dei soggetti esaminati sono stati registrati i sintomi clinici e sono stati valutati i parametri biochimici e sierologici.

### **Campioni biologici**

I campioni di sangue sono stati raccolti in provette con EDTA mediante prelievo dalla vena cefalica. I campioni di cute di circa 30 mg sono stati ottenuti mediante biopsia effettuata in zone con e senza lesioni. L'aspirato linfonodale è stato ottenuto con l'utilizzo di un sottile ago da biopsia. I campioni sono stati conservati a -80 °C. I campioni di urine sono stati centrifugati a 1200 g per 10 minuti. Il precipitato è stato conservato a -80 °C, prima dell'estrazione del DNA.

## **Culture parassitarie**

Il ceppo di referenza IPT1 ZMON1 è stato ottenuto dalla collezione del Centro Nazionale di Referenza della Leishmaniosi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia (Palermo). Il ceppo IPT1 e i ceppi isolati sono stati mantenuti in coltura nel mezzo di agar Tobie (Tobie et al. 1950) modificato da Evans con il 15% di sangue di coniglio, il 5% di siero bovino fetale, 250 µg di gentamicina/ml e 500 µg di 5-fluorocitosina/ml. Le colture sono state incubate a 25 °C per 7 giorni. Nel caso di una coltura negativa, 1 ml del campione di coltura è stato messo in sub-coltura nel mezzo per altri 10 giorni.

## **Saggio di immunofluorescenza indiretta (IFAT)**

Il saggio IFAT è stato realizzato secondo la procedura di Badaro et al. (1983) e Duxbury and Sadun (1964) con alcune modifiche. Per effettuare l'IFAT è stato impiegato come antigene l'IPT1 ZMO1 fissato con bagno di acetone su vetrini da microscopio multispot (Bio-Merieux, Marcy L'Etoile, Francia). Il siero dei cani è stato progressivamente diluito (da 1:40 a 1:1280) in tampone fosfato (PBS) a pH 7.2 e depositato sugli spot sui quali era fissato l'antigene. I vetrini sono stati incubati per 30 minuti a 37 °C. In ciascuna serie di campioni analizzati sono stati inseriti controlli positivi e negativi. La colorazione fluorescente è stata ottenuta utilizzando IgG anti-cane marcate con fluoresceina isotiocianato, diluite 1:100 in PBS e 0,002% in blue di

Evans. I vetrini sono stati osservati al microscopio Leitz Vario Orthomat. Sono considerati positivi i campioni di siero che danno una chiara colorazione giallo-verde fluorescente all'osservazione al microscopio; al contrario, i campioni non reattivi mostrano un colore rosso-marrone. Si è stabilito come valore minimo al quale un risultato è considerato positivo la diluizione di siero 1:40. Il controllo positivo consisteva nel siero a titolo noto di un cane con un esame colturale positivo. Il controllo negativo consisteva nel siero di un cane risultato negativo all'esame colturale.

### **Diagnosi parassitologica**

La diagnosi parassitologica è stata effettuata mediante analisi di PCR su aspirato linfonodale, sangue e biopsia cutanea di cani affetti.

### **Estrazione del DNA**

L'estrazione del DNA da colture parassitarie è stata eseguita come descritto nel lavoro di Schonian et al. (1996), con alcune modifiche. Le colture parassitarie sono state centrifugate a 3500 x *g* a 4 °C per 15 minuti e risospese in un tampone di lisi contenente 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 e 1% di sodio dodecil solfato. La miscela è stata incubata per 30 minuti a 60 °C, successivamente è stata aggiunta la proteinasi K alla concentrazione finale di 0,1 mg/ml e il tutto è stato incubato per 3 ore a 60 °C. In seguito a doppia estrazione con fenolo-cloroformio e alcool

isoamilico (25:24:1, v/v/v), il DNA è stato precipitato con 0,3 M di sodio acetato, ad esso sono stati aggiunti 2,5 volumi di etanolo freddo ed è stato, poi, mescolato per inversione. Il DNA è stato recuperato mediante una centrifugazione a 13.000 g per 20 minuti e, dopo un lavaggio in etanolo al 70%, è stato risospeso in acqua distillata sterile.

Il DNA da tessuto di cane è stato estratto mediante il kit QIAamp Blood and Tissue (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA). 5 µl di precipitato urinario risospeso in PBS oppure 200 µl di sangue o aspirato linfonodale, diluiti con 0,2 ml di PBS sterile, oppure 30 mg di cute ottenuta da biopsia sono stati incubati in un tampone di lisi con 25 µl di proteinasi K (20 mg/ml) per 5 minuti a 70 °C o per tutta la notte a 56 °C. Dopo aver aggiunto 0,2 ml di etanolo, la miscela è stata posta su colonnine della QIAamp e centrifugata. Dopo due lavaggi, il DNA è stato eluito con 200 µl del tampone rimanente pre-riscaldato a 70 °C. La concentrazione e la purezza del DNA estratto è stata valutata spettrofotometricamente ad una assorbanza di 260 e 280 nm.

### **Amplificazione del DNA mediante PCR**

E' stata eseguita l'amplificazione di un tratto di sequenza di 116-bp situata in una regione costante del kinetoplasto della *Leishmania*, utilizzando i seguenti "primers": 5'-dGTGGGGGAGGGGCGTTCT-3' (13a) e 5'-dATTTTACACCAACCCCCAGTT-3' (13b), secondo la metodica descritta da Rodgers et al. (1990). I primers sono stati purificati dalla Celbio s.p.a.

(Milano). Le miscele di reazione sono state preparate in un volume finale di 50 µl contenente 2,0 mM di MgCl<sub>2</sub>, 50 mM di KCl, 10 mM di Tris-HCl (pH 9,3), 0,01 % di Triton X-100, 250 µM di deossinucleotidi trifosfati, 20 pmol di primer 13a e 13b, 2 µl di DNA stampo e 2,5 U di AmpliTaq DNA polimerasi (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). L'amplificazione del DNA è avvenuta in un termociclatore (Perkin-Elmer, Warrington, UK), usando le seguenti condizioni: 94 °C per 1 minuto, 30 cicli a 94 °C per 1 minuto, 60 °C per 1 minuto e 72 °C per 1 minuto, seguiti da un ciclo che prevede un'estensione finale di 5 minuti a 72 °C. Per valutare l'assenza di contaminazioni in ciascuna reazione sono stati inclusi un controllo positivo (2 ng di DNA genomico di *L. infantum* estratti dal ceppo IPT1 ZMON1), un controllo negativo (DNA da sangue, linfonodo, cute o urine ottenuto da cani di controllo) e un tubo di controllo contenente 2 µl di acqua distillata.

I prodotti dell'amplificazione del DNA sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2,5% con 0,1 mg/ml di etidio bromuro in tampone TBE, contenente 89 mM di Tris-HCl, pH 7,2, 89 mM di acido borico e 2 mM di EDTA. Come marcatore di peso molecolare è stato utilizzato DNA ladder di 50 bp. I gels sono stati visualizzati sotto luce UV con un transilluminatore e impressionati su pellicole Polaroid 667.

## **Estrazione dell'RNA e produzione di cDNA**

L'RNA totale è stato estratto da campioni di sangue di cani utilizzando un kit commerciale della Promega. L'RNA è stato risospeso in 100 µl di H<sub>2</sub>O con dietil pirocarbonato (DEPC) e conservato a -80°C fino al momento dell'uso. La sintesi di cDNA per valutare i livelli di mRNA delle citochine è stata effettuata usando un sistema di trascrizione inversa (Im Prom-II<sup>tm</sup> Reverse Transcription System).

## **Sintesi dei primers e delle sonde**

I primers e le sonde fluorogeniche per il DNA della *Leishmania* sono stati scelti nella regione costante del minicircolo del kinetoplasto (NCBI Accession Number AF291093). La sonda fluorogenica è stata marcata in 5' reporter con il fluorocromo 6-carbossi-fluoresceina (FAM) ed in 3' quencer con il fluorocromo 6-carbossi-tetrametil-rodamina (TAMRA) (Applied Biosystems). La costruzione dei primers TaqMan e delle sonde è stata effettuata utilizzando un software "Primers Express" (Applied Biosystems). Nella Tabella 4 sono riportate le sequenze dei primers e delle sonde del DNA di *L. infantum*, dei geni costitutivi della gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) e della  $\beta$ -actina e del mRNA delle citochine. Tutti i primers e le sonde FAM sono state fornite dalla Applied Biosystems.



## Real-time PCR

La real-time PCR è stata effettuata in 25 µl di una miscela di reazione contenente 12,5 µl TaqMan Master Mix (Applied Biosystems), 300 nM di ciascun primer, 250 nM della sonda fluorogenica e 50 ng di DNA o cDNA. Le reazioni sono state condotte nell'apparecchio Abi Prism 7000 (Applied Biosystems) e le condizioni utilizzate sono state le seguenti: un'iniziale incubazione per 2 minuti a 50 °C, seguita da una fase di denaturazione per 10 minuti a 95 °C, 50 cicli a 95 °C per 15 secondi e 60 °C per 1 minuto, ciascuno. I campioni sono stati amplificati in una singola piastra di 96 pozzetti ed in ciascuna di essa sono stati inclusi uno standard (controllo positivo) e un controllo negativo. Il valore di ciclo soglia (Ct) per ciascun campione è stato calcolato determinando il punto in cui l'intensità della fluorescenza supera il valore basale. Per normalizzare eventuali differenze nell'efficienza di estrazione dei campioni o della sintesi di cDNA mediante trascrittasi inversa sono stati utilizzati la  $\beta$ -actina e il GAPDH come geni costitutivi.

Una curva standard è stata preparata utilizzando sette differenti concentrazioni di DNA di *Leishmania*. Per costruire la curva standard, una soluzione madre di DNA di *L. infantum* è stata ottenuta mediante estrazione di DNA da  $10^9$  promastigoti. La concentrazione del DNA è stata determinata mediante lettura spettrofotometrica alle lunghezze d'onda di 260 nm e 280 nm e mediante gel elettroforesi. Sono state preparate diluizioni scalari della

soluzione madre di DNA per ottenere una curva di concentrazioni di DNA corrispondenti ad un intervallo che varia da  $10^6$  parassiti fino a 1 parassita/ $\mu$ l. Per determinare la quantità di *Leishmania* nei tessuti è stato utilizzato il DNA estratto da linfonodo come calibratore; è stato scelto il DNA da linfonodo perchè presenta i più alti livelli di espressione di GAPDH.

Per ottenere le curve standard necessarie per la relativa quantizzazione dei livelli di espressione delle citochine sono state utilizzate diluizioni scalari di una soluzione madre di RNA totale. I livelli di espressione delle citochine di cani sani sono stati scelti come calibratori. Curve standard sia per il gene bersaglio che per il gene costitutivo sono state preparate. Per ogni campione sperimentale è stata determinata la quantità sia del gene bersaglio che del gene costitutivo dalla relativa curva standard. Infine, dal rapporto tra la quantità di DNA del gene bersaglio e quella del gene costitutivo si è ottenuto il valore normalizzato. I relativi livelli di espressione delle citochine sono stati ottenuti dal rapporto tra ciascuno dei valori normalizzati ottenuti e quelli del calibratore.

## Tabella 4

*Sequenze dei primers e delle sonde della L. infantum, del GAPDH, della  $\beta$ -actina e delle citochine*

	Forward primer	Reverse primer	Sonda
<i>Leishmania infantum</i>	5'-GGCGTTCTGCGAAAACCG-3'	5'-AAAATGGCATTTCGGGCC-3'	5'-AAAATGGCATTTCGGGCC-3'
GAPDH	5'-TCCTCTAGCCAAAGTCATCCATGA-3'	5'-GGCATGGACGGTGGTCAT-3'	5'-CCCTCCACGATGCCGAA-3'
$\beta$ -ACTIN	5'-CTGGCACCACACCTTCTACAA-3'	5'-GCCTCGGTCAGCAGCA-3'	5'-CCACGCGCAGCTCG-3'
INF- $\gamma$	5'-GCGGAAAAGGAGTCAGAATCTGTT-3'	5'-CAGGCAGGATGACCATTATTTCGA-3'	5'-TCGAGGCCGAGAGCA-3'
IL-2	5'-GAAGTGCTAGGTTTACCTCAAAGC-3'	5'-CAGATCCCTTTAGTTTCAGAAGTGTTACA-3'	5'-ACACCAAGGAATTAATCAGC-3'
IL-4	5'-GCTCAAAGAACAAGCGATAAG-3'	5'-CTGCCGAGTACAGTAGCA-3'	5'-CTCTGCAGAAGATTTC-3'
IL-10	5'-CCTGGGAGAGAAGCTCAAGAC-3'	5'-CACAGGGAAGAAATCGGTGACA-3'	5'-CTGAGACTGAGGCTGCGAC-3'
IL-12	5'-TGTCAAAAGTAGCAGAGGCTTCTC-3'	5'-CCTCTCTGCTGAAAGTGTCAC-3'	5'-CTCCACATGTCACCCCTTG-3'
IL-18	5'-GTACAGATAATGCACCCCATACCAT-3'	5'-ACTTCACAGAGATAGTTACTGCCAGA-3'	5'-CCTCTAGTGAGGCTATCTTT-3'

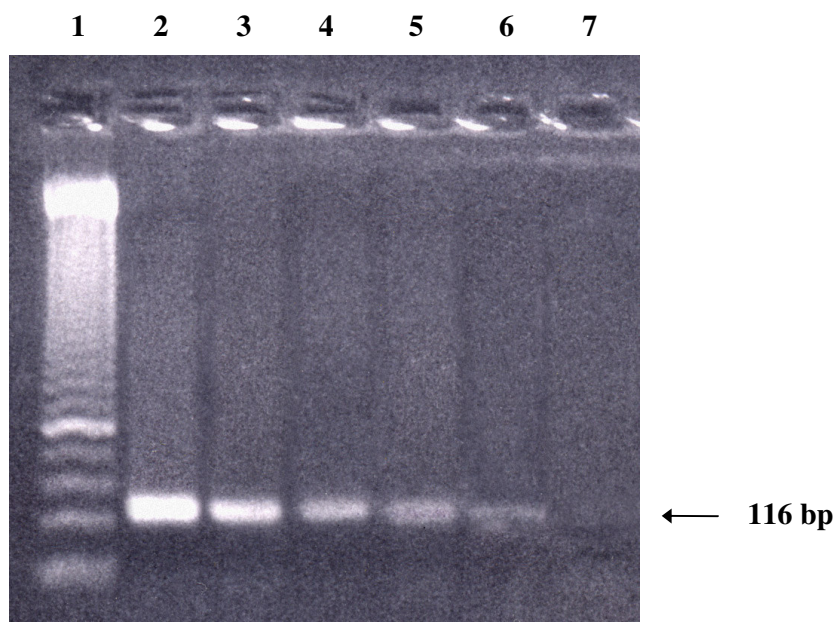
## RISULTATI E DISCUSSIONE

### *Standardizzazione della PCR su tessuti di cute per la diagnosi e il follow-up della leishmaniosi nel cane*

Allo scopo di standardizzare la metodica PCR su tessuti di cute per la diagnosi e il follow-up di leishmaniosi nel cane, è stato effettuato uno studio su 95 cani (32 femmine e 63 maschi) infettati dalla *L. infantum* per via naturale. I cani esaminati appartenevano a diverse razze e avevano un'età compresa tra 1 e 10 anni. Cani sani che vivono in un'area dove la malattia non è endemica sono stati selezionati come controlli negativi. Un trattamento con meglumina (100 mg/kg/giorno, SC) è stato somministrato in combinazione con allopurinolo (10 mg/kg/giorno, PO) a tutti i cani. In 29 cani dei 95, il trattamento con meglumina è stato sospeso dopo un mese, allorchè i segni clinici erano scomparsi e il titolo sierologico diminuito. Ulteriori cicli di trattamento con meglumina sono stati somministrati nello stesso gruppo entro 9 mesi alla comparsa di recidive. Tutti i soggetti hanno ricevuto l'allopurinolo durante l'intero periodo di studio (24 mesi), senza alcun effetto collaterale. Il quadro clinico, la concentrazione totale di proteine e i parametri sierologici sono stati determinati ogni 1-2 mesi dall'inizio della terapia.

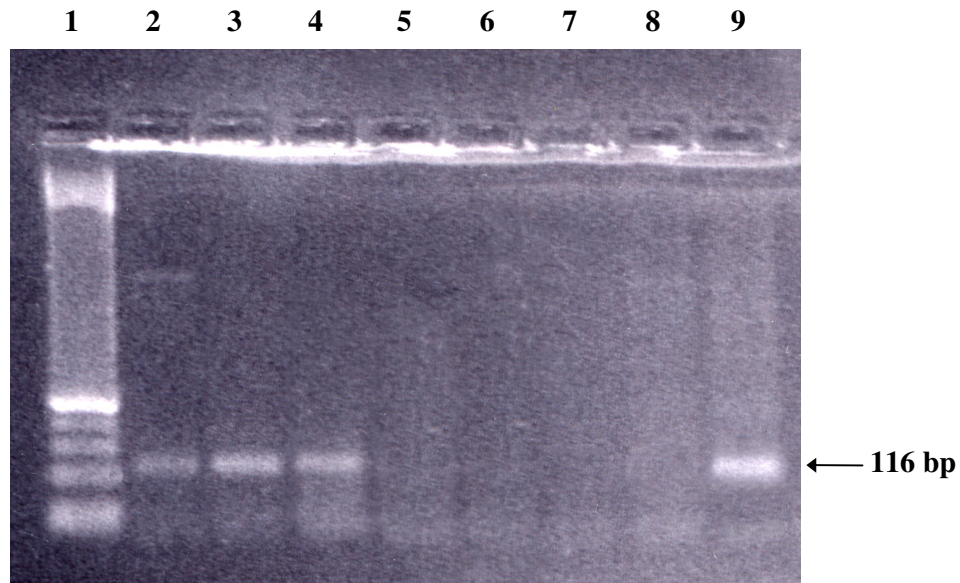
I campioni di sangue intero sono stati prelevati dalla vena cefalica, i campioni di cute, del peso di circa 30 mg, consistevano di biopsie di pelle con o senza lesioni. Aspirati popliteali di linfonodi sono stati ottenuti mediante una sottile siringa da biopsia. Da tali campioni è stato estratto il DNA per l'analisi PCR. Il DNA è stato anche estratto da una coltura di un ceppo di referenza di *L. infantum* IPT1 ZMONI gentilmente fornito dal Centro di Referenza della Leishmaniosi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia (Palermo). L'analisi PCR effettuata su diluizioni scalari di DNA purificato da promastigote di *Leishmania* ha mostrato un prodotto chiaramente visibile di 116 bp con i primers 13a e 13b da un minimo di 1 pg di DNA (Figura 5). L'analisi PCR effettuata con gli stessi primers sul DNA estratto da promastigoti di *L. infantum* e DNA totale genomico estratto dai campioni di cani infetti ha amplificato il prodotto atteso di 116 bp (Figura 6).

**Figura 5**



Risultati della PCR eseguita con *AmpliTaq* DNA polimerasi e i primers 13a and 13b su diluizioni scalari (1:10) di DNA ottenuto dal ceppo purificato di *L. infantum* IPT1 ZMON1. Canale 1, 50 bp DNA ladder; canali 2-6, 10 ng, 1 ng, 0.1 ng, 0.01 ng, and 1 pg di DNA purificato da *L. infantum*, rispettivamente; canale 7, controllo negativo costituito solo dalla miscela di reazione della PCR.

**Figura 6**



Risultati della PCR eseguita con *AmpliTaq* DNA polimerasi e i primers 13a and 13b su tipi differenti di campioni biologici provenienti da cani affetti da leishmaniosi. Canale 1, 50 bp DNA ladder; canali 2-4, DNA estratto da sangue, linfonodi e biopsia cutanea di un cane infettato, rispettivamente; canali 5-7, controllo negativo eseguito su DNA purificato da sangue, linfonodi e biopsia cutanea di cani non affetti; canale 8, controllo negativo costituito solo dalla miscela di reazione della PCR; canale 9, controllo positivo utilizzando 1 ng di DNA ottenuto dal ceppo purificato di *L. infantum* IPT1 ZMON1.

In Tabella 5 sono riportati i risultati dell'IFAT e della PCR sui campioni di sangue dei cani affetti da *Leishmania* al tempo della diagnosi. Gli animali sono stati divisi in gruppi a seconda del risultato negativo o positivo all'analisi sierologica e alla PCR. In ciascun gruppo è stato determinato il numero di animali che mostrava o non mostrava segni cutanei d'infezione; i cani sono stati classificati anche in base all'età. Tutti i cani hanno mostrato uno o più segni clinici di leishmaniosi canina, e 41 dei 95 cani (43,1 %) avevano lesioni cutanee. 81 soggetti (85,3 %) erano sieropositivi all'IFAT (titolo  $\geq 1:40$ ), ma 12 di questi avevano un titolo vicino alla soglia limite (1:40). Tutti i cani risultavano positivi in almeno uno dei campioni. Degli 81 soggetti positivi all'IFAT, 71 (87,6 %) erano anche positivi alla PCR su tutti i campioni biologici, 4 (4,9 %) davano PCR positiva su linfonodo e cute, 1 (1,2%) risultava positivo nel sangue e nella cute, 1 (1,2 %) positivo alla PCR solo su linfonodo.

Dei 14 soggetti negativi all'IFAT, 13 (92,8 %) erano positivi alla PCR su sangue, linfonodo e cute, e 1 (7,1 %) era negativo alla PCR su sangue.

Su un totale di 41 cani con segni cutanei di leishmaniosi, 19 su 22 cani con un'età compresa tra 1 e 3 anni erano positivi sia all'IFAT che alla PCR in tutti e tre i campioni biologici, mentre 3 casi erano sieronegativi. Tutti i 17 soggetti con un'età compresa tra 4 e 7 anni erano sieropositivi; 16/17 casi erano anche positivi alla PCR su tutti i campioni biologici e solo 1/17 casi era



negativo alla PCR sul campione di cute. Fra i cani con un'età maggiore di 7 anni, 1 era negativo all'IFAT e positivo alla PCR, l'altro aveva un titolo IFAT vicino alla soglia limite (1:40) ed era positivo alla PCR solo su linfonodo.

Su un totale di 54 cani affetti da leishmaniosi che non mostravano lesioni cutanee, 21 su 31 con un'età compresa tra 1 e 3 anni risultavano positivi all'IFAT e alla PCR, 4 soggetti erano sieropositivi, ma 2 erano negativi alla PCR su sangue e gli altri 2 erano negativi alla PCR su cute, 5 cani erano sieronegativi e positivi alla PCR su tutti i campioni biologici, 1 soggetto era negativo all'IFAT e alla PCR su sangue. 16 di 20 cani con un'età compresa tra 4 e 7 anni erano sieropositivi: 12 di essi erano positivi anche alla PCR su tutti i campioni biologici, mentre 2 erano negativi alla PCR su sangue, 1 era negativo alla PCR su cute e 1 negativo sul linfonodo; gli altri 4 dei 20 risultavano negativi all'IFAT, ma positivi alla PCR su tutti e tre i campioni biologici. I 3 cani di sette anni erano sieropositivi e positivi alla PCR su tutti e tre i campioni biologici.

In tabella 6 sono riportati i risultati sierologici e dell'analisi alla PCR, la concentrazione totale di proteine e le recidive di 29 soggetti alla prima osservazione e dopo 12 e 24 mesi dal trattamento con meglumina e allopurinolo. Solo 7 di loro sono andati incontro a recidiva durante il periodo della terapia. 24 cani erano sieropositivi alla prima osservazione (5 cani avevano un titolo IFAT vicino alla soglia limite). Dopo 12 e 24 mesi di terapia il numero di cani sieropositivi era di 23 e 13, rispettivamente. Il

numero di cani su cui l'analisi alla PCR rivelava la presenza di parassiti su sangue, linfonodi e cute erano rispettivamente 26, 29 e 27 rispettivamente. Dopo 12 mesi di terapia 23 cani erano positivi alla PCR, mentre non si osservava alcuna differenza nel numero di soggetti positivi alla PCR sui campioni di linfonodo e cute. Al termine del follow-up il numero di cani con PCR positiva su sangue, linfonodo e cute decresceva a 11, 26 e 23 rispettivamente.

La concentrazione delle proteine sieriche era aumentata in 17 cani su 24 (70,1 %) che avevano un titolo IFAT positivo prima dell'inizio della terapia. Il trattamento terapeutico aveva prodotto un miglioramento clinico e un parallelo decremento del titolo IFAT con una diminuzione della concentrazione delle proteine sieriche in 10 cani (58,8 %) dopo 12 mesi e in 13 soggetti (76,5 %) dopo 24 mesi di terapia. Durante il periodo di osservazione, quando i cani recidivavano si riscontrava un aumento della concentrazione totale di proteine e del titolo sierologico.

**Tabella 5**

*Confronto fra i risultati ottenuti mediante IFAT e PCR su campioni biologici raccolti da 95 cani affetti da leishmaniosi al momento della diagnosi*

IFAT	Presenza di DNA da <i>Leishmania</i>			n° di cani infetti						n° totale di cani
	Sangue	Linfonodi	Cute	con lesioni cutanee			senza lesioni cutanee			
1-3 anni				4-7 anni	> 7 anni	1-3 anni	4-7 anni	> 7 anni		
+	+	+	+	17	15	0	17	10	2	61
1:40*	+	+	+	2	1	0	4	2	1	10
+	-	+	+	0	0	0	2	1	0	3
1:40	-	+	+	0	0	0	0	1	0	1
+	+	+	-	0	1	0	2	1	0	4
+	+	-	+	0	0	0	0	1	0	1
-	+	+	+	3	0	1	5	4	0	13
-	-	+	+	0	0	0	1	0	0	1
1:40	-	+	-	0	0	1	0	0	0	1

\*1:40 = valore soglia per un risultato positivo dell'IFAT

## Tabella 6

### *Follow-up sierologico e parassitologico di 29 cani naturalmente infetti da Leishmania*

**tempo: 0 mesi**

N° di cani	*TP > 7.6 g/dl	IFAT	PCR		
			Sangue	Linfonodi	Cute
13	+	+	+	+	+
4	-	+	+	+	+
1	+	1:40	+	+	+
2	-	1:40	+	+	+
1	+	1:40	-	+	+
1	-	1:40	-	+	-
3	+	-	+	+	+
2	-	-	+	+	+
1	+	+	-	+	+
1	+	+	+	+	-

**tempo: 12 mesi**

N° di cani	TP > 7.6 g/dl	IFAT	PCR			Recidive
			Sangue	Linfonodi	Cute	
9	+	+	+	+	+	4
4	-	+	+	+	+	-
3	+	1:40	+	+	+	1
4	-	1:40	+	+	+	-
2	-	1:40	-	+	+	-
3	-	-	+	+	+	-
1	-	-	-	+	+	-
1	-	-	-	+	-	-
1	+	-	-	+	+	-
1	+	+	-	+	-	-

**tempo: 24 mesi**

N° di cani	TP > 7.6 g/dl	IFAT	PCR			Recidive
			Sangue	Linfonodi	Cute	
5	+	+	+	+	+	3
1	-	+	+	+	+	-
1	-	1:40	+	+	+	-
1	+	1:40	-	+	+	-
4	-	1:40	-	+	+	-
1	-	1:40	-	+	-	-
3	-	-	+	+	+	-
1	+	-	+	+	+	-
4	-	-	-	+	+	-
5	-	-	-	+	-	-
3	-	-	-	-	+	-

\*TP = Proteine sieriche totali

I risultati ottenuti, anzitutto, dimostrano che l'analisi PCR effettuata su sangue, linfonodi o biopsie cutanee da cani infetti è più sensibile dell'IFAT (100% positivi alla PCR rispetto all'85% di positività all'IFAT, incluso 15% di positivi borderline) (Manna et al. 2004). La positività alla PCR mostrata dai casi negativi all'IFAT può essere dovuta all'immunodeficienza dei pazienti (Slappendel and Ferrer 1998) e alla conseguente incapacità di produrre sufficienti quantità di anticorpi. Tale discrepanza è stata riportata in altri studi (Berrahal et al. 1996; Reale et al. 1999). Questo risultato è indicativo della inaffidabilità della sierologia, dal momento che i risultati PCR sono stati validati dall'applicazione del metodo a più di un tipo di campione biologico. Un test diagnostico basato sulla PCR su sangue o su biopsia cutanea presenta il vantaggio che la raccolta dei campioni non richiede procedure invasive come richiede invece la raccolta di aspirati linfonodali, ed, inoltre, possono essere facilmente processati. La scelta del materiale biotico non appare critica, dal momento che la sensibilità della PCR sul sangue o sulle biopsie cutanee non è significativamente diversa (94% e 95% di positività, rispettivamente) (Manna et al. 2004). Il vantaggio di usare la biopsia cutanea anziché il sangue nella diagnosi di leishmaniosi canina risiede nel fatto che la quota di parassita nel sangue tende ad abbassarsi nel corso dell'infezione.

I cani infetti da *L. infantum* sviluppano sia lesioni viscerali che integumentarie (Slappendel 1988); ma mentre l'infezione può manifestarsi

solo a livello cutaneo in alcuni tipi di leishmaniosi umana, nel cane ciò non accade. Malgrado, tuttavia, la natura viscerotropica della *L. infantum*, lesioni cutanee quali dermatiti alopeciche o dermatosi ulcerative e distruttive possono manifestarsi nel cane (Ferrer et al. 1988). L'efficienza della risposta immunitaria del cane sembra essere responsabile di una varietà di lesioni integumentarie nei cani infetti per via naturale (Pinelli et al. 1994).

I risultati ottenuti in questo lavoro mostrano che indipendentemente dalla presenza di lesioni cutanee, la cute rappresenta un substrato affidabile per la diagnosi di leishmaniosi viscerale canina. Inoltre, le zanzare trasmettono il parassita attraverso la puntura della cute del cane e, pertanto, questo tessuto può rappresentare il principale serbatoio di *Leishmania*.

I risultati sul follow-up dei cani trattati mostrano che la terapia promuove un decremento della quota parassitaria nel sangue dei soggetti con conseguente abbassamento del titolo sierologico e PCR negativa. Al contrario, l'analisi di PCR dei campioni di cute come quella dei linfonodi degli stessi soggetti dà ancora risultati positivi, indicando ciò che gli animali restano infetti anche se asintomatici per estesi periodi di tempo. Poichè, però, la terapia causa la regressione dei linfonodi, il loro prelievo diviene difficoltoso. Quando i cani recidivano sia il titolo sierologico che la PCR su sangue tornano positivi. Tali risultati dimostrano che la cute può rappresentare uno dei migliori substrati per la diagnosi e il follow-up della leishmaniosi viscerale nel cane basati su metodologie di PCR.

*Standardizzazione della real-time PCR su campioni di urine per il trattamento clinico di cani leishmaniotici con coinvolgimento renale*

Negli ultimi anni è stata dimostrata la efficacia della quantificazione della quota parassitaria nei diversi tessuti dei pazienti infetti per un migliore trattamento della malattia grazie all'introduzione di una metodica PCR quantitativa, la real-time PCR (Schulz et al., 2003; Mary et al., 2004; Rolao et al., 2004; Wortmann et al. 2005; Francino et al., 2006). In questo studio, pertanto, è stata messa a punto una procedura per l'analisi del numero di parassiti presenti nelle urine di cani infetti. La quota di DNA di *Leishmania* presente nelle urine dei soggetti è stata confrontata con quella ritrovata nel sangue e nei linfonodi e correlata allo stato clinico dei cani infetti.

Lo studio è stato effettuato su 41 cani con sintomi clinici di infezione da *L. infantum* che risultavano positivi all'IFAT e alla RT-PCR su linfonodo al tempo della diagnosi. I cani infetti appartenenti a razze diverse e di differente sesso, con un'età compresa fra 1 e 10 anni, sono stati suddivisi in tre gruppi: 22 cani che mostravano solo lesioni cutanee (gruppo 1); 12 cani affetti da linfadenopatia ed ematuria (gruppo 2); 7 cani che avevano segni clinici di una grave nefropatia. Tre cani sani che vivono in un'area dove la malattia non è endemica sono stati selezionati come controlli negativi. Tutti i cani sono stati sottoposti ad analisi di laboratorio comprendenti la determinazione delle proteine sieriche totali, creatinina, urea, albumina, esame chimico-fisico delle

urine e valutazione del sedimento, e determinazione del rapporto proteine urinarie-creatinina (U P/C). E' stata, inoltre, effettuata diagnosi differenziale con infezioni che avrebbero potuto causare gli stessi sintomi clinici e risultati laboratoristici, quali l'erlichiosi, la babesiosi e la leptospirosi, sia mediante IFAT che RT-PCR. Non sono state evidenziate coinfezioni in tutti i cani esaminati appartenenti ai tre gruppi.

La quantificazione dei parassiti nei differenti tessuti ha evidenziato differenze tra i diversi gruppi di cani caratterizzati da diverso quadro clinico.

Il gruppo 1 di cani che mostrava solo segni cutanei senza coinvolgimento renale presentava tutti i livelli sierici dei parametri biochimici negli intervalli normali con la sola eccezione delle proteine totali e delle beta globuline che risultavano leggermente più elevate del valore normale. L'analisi delle urine dei 22 soggetti mostrava un valore alterato dell'U P/C (Tabella 7). Il numero di parassiti determinato mediante real-time PCR è risultato maggiore nei linfonodi e nel sangue che non nelle urine, seppure un numero significativo di parassiti è stato rilevato in queste ultime (Figura 7). Tali risultati confermano molteplici evidenze che dimostrano che l'aspirato linfonodale rappresenta il miglior substrato sia per la PCR convenzionale che per la real-time PCR impiegate per la diagnosi e il follow-up dei cani leishmaniotici (Manna et al. 2004; Francino et al. 2006). Poiché la raccolta dei linfonodi richiede, però, una procedura invasiva, questi dati confermano la possibilità di un uso



affidabile del sangue o anche delle urine per la real-time PCR nella diagnosi e nel monitoraggio di cani infetti da *Leishmania* con un quadro clinico lieve.

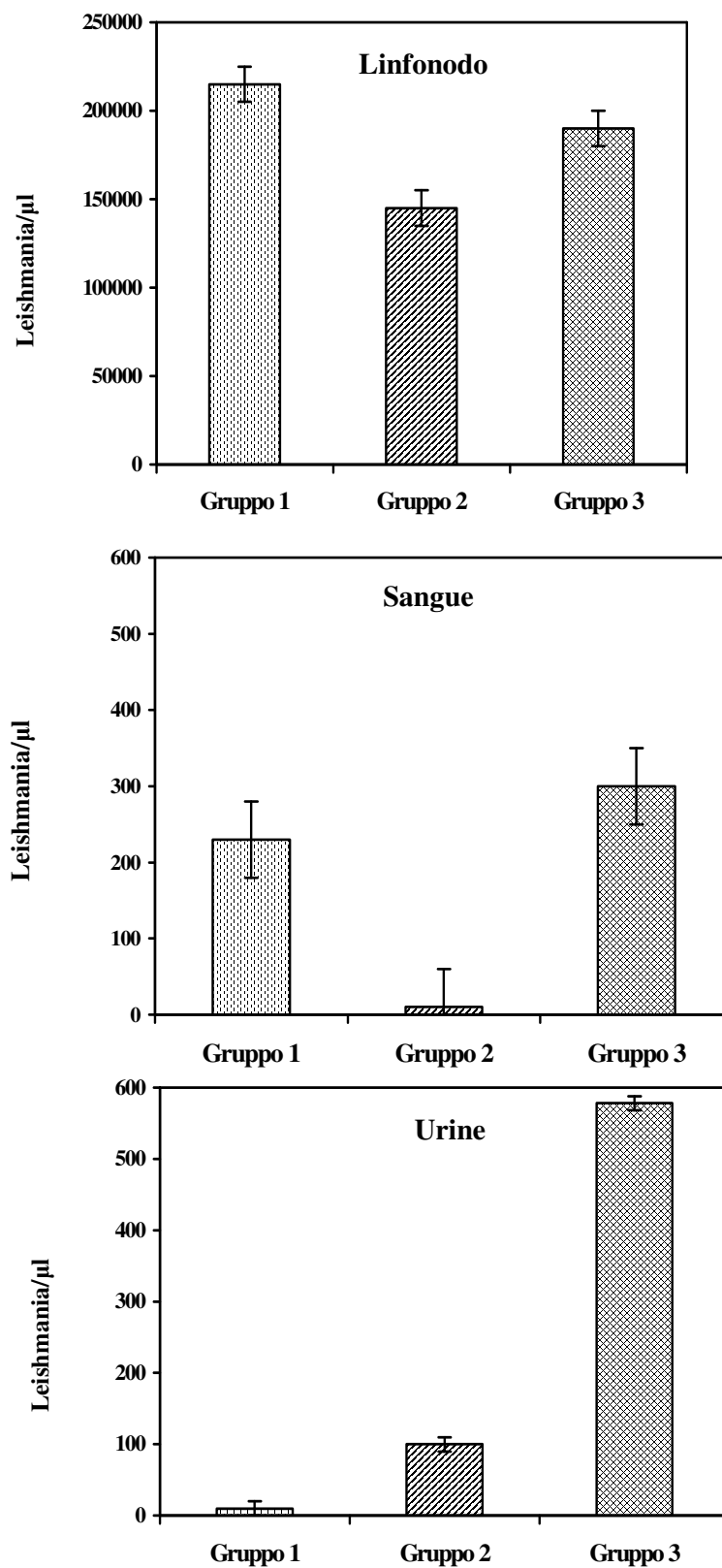
Il gruppo 2 di cani che mostravano ematuria e linfadenopatia, ma non lesioni cutanee, avevano i livelli delle globuline sieriche più alti dei valori normali, mentre i livelli di albumina e il rapporto A/G più bassi dei valori normali. Anche l'U P/C risultava alterato (Tabella 7). Questi dati di laboratorio indicano che la malattia in questi cani potrebbe progredire verso un'insufficienza renale. Nell'uomo, il coinvolgimento renale è stato dimostrato in pazienti affetti da leishmaniosi viscerale che mostravano ematuria, proteinuria e alti livelli di albumina (Salgado Filho et al. 2003). Il danno renale, tuttavia, in tali soggetti può essere lieve e regredire con la cura dell'infezione (Dutra et al. 1985). Nel nostro studio, per il gruppo 2 di cani che mostravano ematuria quale sintomo clinico l'analisi mediante real-time PCR mostrava una quantità di DNA di *Leishmania* nelle urine maggiore di quella presente nel sangue (Figura 7). La quota di parassiti nel linfonodo, tuttavia, restava superiore rispetto a quella presente sia nel sangue che nelle urine.

I 7 cani classificati come gruppo 3 mostravano segni clinici correlati ad insufficienza renale. Essi presentavano un profilo alterato sia dei parametri biochimici sierici che di quelli urinari: in particolare i livelli sierici di urea, creatinina, e beta globuline erano molto più alti dei valori normali, mentre l'albumina e il rapporto A/G risultavano più bassi dei valori normali. Questi

cani avevano un rapporto U P/C significativamente più alto di quello dei cani appartenenti al gruppo 1 e al gruppo 2 (Tabella 7). Il sedimento urinario per il gruppo 3 di soggetti era compatibile con insufficienza renale, mentre quello del gruppo 2 era compatibile con l'ematuria; i cani del gruppo 1 avevano un sedimento urinario normale. Per il gruppo 3 di cani l'analisi mediante real-time PCR mostrava una quantità di organismi di *Leishmania* nelle urine superiore a quella presente nel sangue. I campioni di linfonodi di questi soggetti, tuttavia, contenevano un numero di parassiti superiore agli altri due tipi di campioni biologici (Figura 7). Nessuna *Leishmania* fu ritrovata nelle urine, nel sangue e nei linfonodi dei campioni raccolti dai 3 soggetti sani selezionati come controlli negativi.

**Figura 7**

*Quantità di Leishmania misurata mediante real time PCR in differenti campioni prelevati da cani naturalmente infetti*



## Tabella 7

### *Parametri di laboratorio dei cani infetti*

Parametro		Stato clinico			Range normale	t test
		Segni cutanei	Ematuria	Insufficienza renale		
Siero	Urea (mg/dl)	26.90 ± 5.6	29.30 ± 8.2	204 ± 80.8 <sup>b</sup>	25-50	P <0.001
	Creatinina (mg/dl)	1.00 ± 0.2	0.95 ± 0.2	3.17 ± 1.3 <sup>b</sup>	< 1.8	P <0.001
	Proteine totali (g/dl)	8.20 ± 1.3 <sup>b</sup>	6.71 ± 0.5	9.02 ± 1.0 <sup>b</sup>	6-7.8	P <0.05
	Gamma globuline (g/dl)	1.71 ± 1.2	2.87 ± 0.2 <sup>b</sup>	5.49 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.9-2.2	P <0.05
	Beta globuline (g/dl)	1.84 ± 0.6 <sup>b</sup>	2.38 ± 0.3 <sup>b</sup>	4.10 ± 0.9 <sup>b</sup>	0.6-1.4	P <0.05
	Alpha 2 globuline (g/dl)	0.84 ± 0.2	1.68 ± 0.2 <sup>b</sup>	0.70 ± 0.2	0.3-1.1	P <0.05
	Alpha 1 globuline (g/dl)	0.36 ± 0.1	0.65 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.32 ± 0.1	0.2-0.5	NS
	Albumina (g/dl)	2.96 ± 0.5	1.43 ± 0.3 <sup>b</sup>	1.09 ± 0.5 <sup>b</sup>	2.3-3.4	P <0.05
	Rapporto A/G	0.71 ± 0.3	0.37 ± 0.2 <sup>b</sup>	0.29 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.70-1.11	P <0.01
Urine	Rapporto U P/C	2.41 ± 10.2 <sup>b</sup>	5.50 ± 3.1 <sup>b</sup>	41.06 ± 27.3 <sup>b</sup>	<1	P <0.001
	Densità (g/ml)	1.020 ± 4.5	1.031 ± 8.8	1.010 ± 9.8	>1,020	NS

<sup>a</sup> I dati riportati rappresentano la media ± deviazione standard dei risultati ottenuti. NS, non significativo.

<sup>b</sup> Valore alterato

L'infezione da *Leishmania* di solito provoca nei cani insufficienza renale cronica caratterizzata da glomerulonefriti, nefriti interstiziali e occasionalmente amiloidosi (Poli et al. 1991, Nieto et al. 1992, Costa et al. 2003). La deposizione di immunocomplessi può causare una reazione infiammatoria secondaria e una diminuita perfusione dei capillari peritubulari può provocare ischemia del tessuto tubulare e interstiziale (Lopez et al. 1996). Quale conseguenza si può osservare proteinuria che può essere rilevante o moderata a seconda dell'evoluzione della malattia (Grauer et al. 1985, Palacio 1995, Solano-Gallego et al. 2003). La proteinuria è stata, tuttavia, osservata anche in cani privi di evidenti lesioni morfologiche renali e con normale funzione renale (Bonfanti et al. 2004). In questo studio, tutti i cani appartenenti ai tre gruppi, ivi inclusi i cani che mostravano solo segni cutanei e nessun sintomo di nefropatia, avevano un U P/C superiore a 1, seppure di diverso grado. I risultati ottenuti mediante la real-time PCR indicano che le urine rappresentano un tool affidabile per il management clinico dei cani con segni clinici e laboratoristici di un lieve danno renale. Poichè, infatti, nei cani affetti da gravi insufficienze renali la malattia in genere porta alla morte dell'animale, il significato di quantificare i parassiti presenti nelle loro urine o in altri tessuti avrebbe vantaggi clinici limitati.

*Valutazione della quantità di DNA di Leishmania e dell'accumulo di mRNA di citochine nei tessuti di cani infetti asintomatici*

Allo scopo di misurare mediante l'impiego della real-time PCR sia la quota di *Leishmania* in differenti tessuti sia i livelli di espressione di alcune citochine relative ai pattern Th1 e Th2 nel sangue di due gruppi di cani infetti asintomatici, sono stati esaminati 60 cani di differenti razze e di età compresa tra 1 e 10 anni, infetti da *L. infantum* per via naturale, che vivono nell'area endemica del Sud Italia. I soggetti esaminati sulla base dei risultati mediante analisi PCR sono stati suddivisi nei seguenti gruppi: 20 cani infetti asintomatici che non hanno manifestato sintomi durante tutto il periodo dello studio, 20 cani infetti asintomatici che sono andati incontro alla malattia manifesta, 20 cani malati sintomatici selezionati come controlli positivi. Quale controllo negativo, allo scopo di dosare i livelli basali di citochine in condizioni normali fisiologiche, è stato selezionato un gruppo di 20 cani non infetti, che vivono in un'area non endemica dell'Abruzzo. Questo gruppo è stato monitorato ogni mese attraverso analisi PCR qualitativa per tutto il periodo della sperimentazione. Tutti i cani sono stati monitorati da un punto di vista parassitologico, clinico e immunologico circa ogni due mesi per due anni. Durante lo studio una percentuale di cani è diventata sintomatica. L'infezione è stata confermata da analisi PCR e attraverso il saggio IFAT.

*a) Quantità di DNA di Leishmania e misura dei livelli di espressione di citochine in cani infetti asintomatici progredienti verso la malattia*

Il gruppo di 20 cani selezionati per questo studio al momento della diagnosi non mostrava segni clinici di infezione. Tutti i loro parametri ematologici e i profili biochimici erano nella norma. I cani presentavano, tuttavia, un titolo positivo all'IFAT (da 1:40 a 1:640) e risultavano positivi alla PCR in almeno uno dei campioni biologici saggiati (sangue, linfonodo, pelle).

La presenza di piccole quantità di *Leishmania* è stata osservata nei linfonodi e nel sangue di questi cani mediante real-time PCR, mentre erano presenti livelli molto elevati di parassita nelle biopsie della cute ( $\geq 700$  *Leishmania*/ml) (Figura 8A). Nelle condizioni sperimentali utilizzate, la variabilità intra-analisi della quantificazione era in un range  $< 2\%$ , concordante con quella di altri studi (Schulz et al. 2003). L'analisi dei livelli di espressione delle citochine nei campioni di sangue di questi cani mediante real-time PCR ha mostrato la presenza di alti livelli di IL-18, mentre le altre citochine in esame erano assenti (Figura 8B).

Nei cinque mesi successivi alla prima osservazione, i cani hanno sviluppato i segni clinici della malattia (febbre, zoppia, linfadenopatia, lesioni della cute e ulcere, alopecia, dimagrimento, onicogrifosi, ecc.). Sono comparse trombocitopenia, anemia e leucopenia. I titoli IFAT erano

aumentati e l'analisi di PCR è risultata positiva in tutti i campioni biologici testati.

Sei mesi dopo la prima osservazione, la quantità di DNA della *Leishmania* misurata mediante real-time PCR ha superato 2300 *Leishmania*/ml nei campioni linfonodali. Un aumento della quantità di parassita, pur se di minor grado, è stato anche osservato nei campioni di sangue, mentre il numero di parassiti rilevati a livello dei campioni di cute risultava diminuito (Figura 8C). Nella Figura 8D è riportato il profilo di espressione delle diverse citochine e la loro quantità nel sangue di tali cani. Mentre i trascritti di mRNA dell'IL-18 sono diminuiti, i livelli delle IL2, IL4 e IL10 sono risultati aumentati. Sono stati osservati, inoltre, bassi livelli di IFN- $\gamma$  e una quantità significativa di IL-12.

*b) Quantità di DNA di Leishmania e misura dei livelli di espressione di citochine in cani infetti asintomatici per periodi prolungati*

Il secondo gruppo di 20 cani selezionati non mostrava segni clinici dell'infezione da *Leishmania* al momento della prima osservazione. Tutti i parametri ematologici e biochimici rientravano nei range normali, ma i cani erano sierologicamente positivi (titolo IFAT compreso tra 1:40 e 1:320) e la PCR risultava positiva in almeno uno dei campioni biologici saggiati. La quantità di parassiti misurata mediante real-time PCR nei tessuti di tali cani era elevata nella cute ( $\geq 1300$  *Leishmania*/ml) e nei linfonodi ( $>500$



*Leishmania*/ml), minore nel sangue (Figura 8A). Sono stati rilevati i livelli di espressione di citochine nel sangue di questi cani mediante real time PCR che hanno mostrato alti livelli di IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL 18 (Figura 8B).

Sei mesi dopo, i cani erano ancora poco sintomatici; nonostante ciò, il titolo IFAT era aumentato ed alcuni parametri ematologici e biochimici, come il numero di globuli rossi e bianchi, l'AST, l'ALT e la  $\gamma$ GT, erano alterati. La quantità di *Leishmania* misurata con real-time PCR era di poco aumentata nei campioni di sangue e linfonodali, mentre risultava immodificata nei campioni di cute (Figura 8C). Contemporaneamente, il profilo di espressione delle citochine nel sangue di tali cani, valutato mediante real-time PCR, risultava modificato dalla comparsa delle citochine IL-4 e IL-10, oltre alla presenza di IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL 18. L'unica citochina assente era IL-12. I livelli di espressione di tali citochine erano simili l'una con l'altra (Figura 8D).

I cani sono stati monitorizzati 18 mesi dopo la prima osservazione. Durante tale periodo, si è osservato una diminuzione della quantità di *Leishmania* in tutti e tre i campioni biologici saggiati mediante real-time PCR; tuttavia, alla fine del periodo dello studio (24 mesi dopo la prima osservazione) il numero di parassiti nel sangue, nei linfonodi e nella cute era appena significativo (<100, <300 e <10 parassiti/ml, rispettivamente) (Figura 8E). Il profilo di espressione delle citochine mostrava una progressiva

scomparsa di tutte le citochine, tranne l'IL-4 che era ancora presente a livello significativo nel sangue dei cani (Figura 8F).

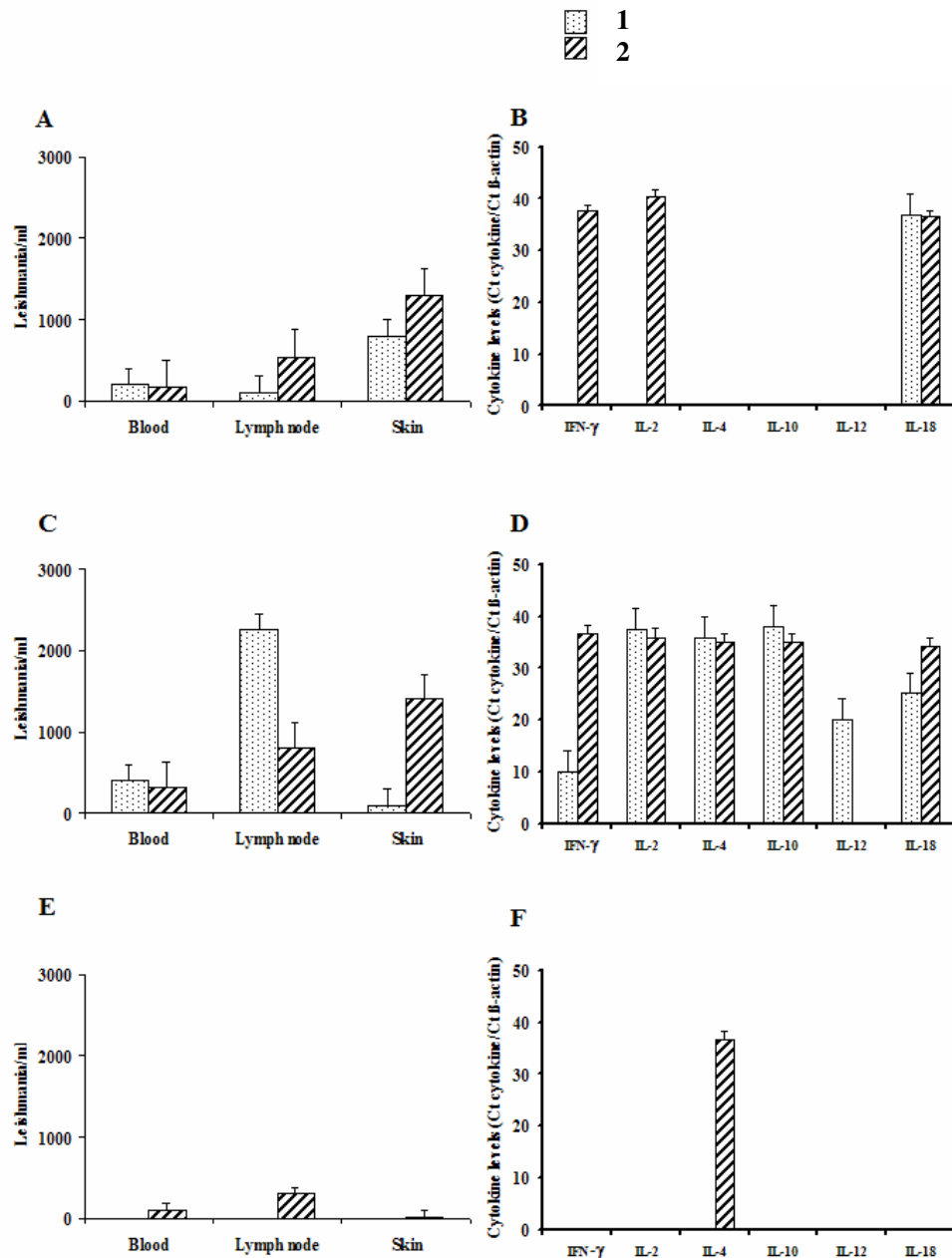
*c) Quantità di DNA di Leishmania e misura dei livelli di espressione di citochine in cani malati sintomatici (controlli positivi) ed in cani sani non infetti (controlli negativi)*

Un gruppo di 20 cani sintomatici naturalmente infetti è stato scelto come controlli positivi. Al momento della diagnosi, questi cani mostravano titoli sierologici elevati (IFAT compreso tra 1:160 e 1:1280) e si mostrarono positivi alla PCR in tutti i campioni biologici saggiati. All'esame clinico i cani presentavano sia lesioni cutanee che viscerali. Tutti i cani mostravano trombocitopenia, anemia, leucopenia ed un aumento delle proteine totali. Nelle biopsie linfonodali di tali cani si è riscontrato un'alta quantità di *Leishmania* (Figura 9A). Anche se in minor grado, la *Leishmania* era presente anche negli altri due tessuti testati. Il profilo dei livelli di espressione delle citochine ha mostrato livelli significativi di tutte le citochine misurate nel sangue di tali cani (Figura 9B). L'esame comparativo dei livelli di citochine in tali cani ha dimostrato che la proporzione fra l'IFN- $\gamma$  e le altre citochine nel gruppo dei cani di controllo positivi era simile al quadro presente degli animali asintomatici che si ammalavano, anche se a livelli più bassi. La *Leishmania* era presente anche negli altri due tessuti saggiati, anche se in minore quantità.

Un altro gruppo di 20 cani sani viventi in aree non endemiche è stato selezionato come controllo negativo. L'analisi di PCR dei campioni tissutali così come l'IFAT erano negativi. La *Leishmania* non era presente in nessuno dei campioni biologici analizzati e la quantificazione mediante real-time PCR dei livelli di espressione delle citochine nei campioni di sangue di questi cani ha evidenziato la presenza solo dell'IL-18.

**Figura 8**

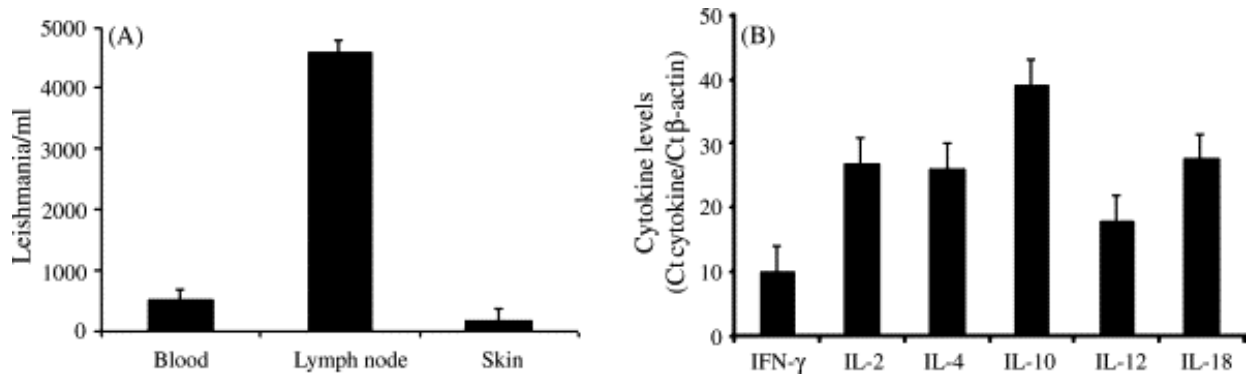
*Comparazione della quantità di DNA di Leishmania e dei livelli di citochine in cani infetti asintomatici che progrediscono (1) o non progrediscono verso la malattia conclamata (2) in un periodo di due anni.*



La quantità di parassiti misurata mediante real-time PCR nel sangue, linfonodi e cute (pannelli A–C) ed i livelli di IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 e IL-18 (pannelli B–D) rappresentano la media  $\pm$  S.D. di 20 cani infetti asintomatici al momento della prima osservazione (pannelli A e B), 6 mesi dopo (pannelli C e D), e 24 mesi dopo la prima osservazione solo per i cani che non sono evoluti in malattia manifesta (pannelli E e F).

## Figura 9

*Comparazione della quantità di DNA da Leishmania e dei livelli di citochine nel gruppo di cani di controllo positivi*



La quantità di parassiti nel sangue, nei linfonodi e nella cute (panello A), e i livelli di IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 and IL-18 (panello B) di 20 cani malati naturalmente infetti sono stati misurati mediante real-time PCR.

da: Manna L et al, 2006. Vet Parasitol, in press

Il sistema immunitario gioca un ruolo chiave sia nell'insorgenza dell'infezione da *Leishmania* nel cane, sia nella risposta alla terapia (Pinelli et al. 1994; Guarga et al., 2002). I cani che mostrano un efficiente risposta immunitaria sono in grado di controllare l'infezione, mentre quelli con un sistema immunitario inefficiente sviluppano un quadro clinico severo e spesso non rispondono alla terapia o recidivano. Non è, tuttavia, sempre agevole trovare dei parametri che possano predire accuratamente l'evoluzione e la risposta.

In questa ricerca, per la prima volta il sistema della real-time PCR è stato utilizzato per correlare la quantità di DNA della *Leishmania* ed i livelli di espressione delle citochine in campioni biologici di cani asintomatici, naturalmente infetti con lo stato clinico e l'evoluzione della malattia (Manna et al. 2006 in press). La quantificazione dei parassiti presenti nei tre tessuti esaminati (sangue, cute e linfonodo) ha mostrato differenze tra i due gruppi selezionati di cani. Nei cani infetti asintomatici che hanno sviluppato la malattia elevate quantità di DNA di *Leishmania* sono state riteovate nelle biopsie cutanee al tempo della diagnosi. La quantità di DNA di parassita presente nella cute, tuttavia, è diminuita con la comparsa dei sintomi clinici, mentre si è registrato un drammatico incremento di quota di *Leishmania* negli aspirati linfonodali di questi animali.

Nel secondo gruppo di cani che è rimasto asintomatico durante il periodo dello studio, al tempo della prima osservazione, un'elevata quantità di *Leishmania* è stata riscontrata sia nelle biopsie cutanee sia negli aspirati linfonodali. Successivamente la quota di DNA di *Leishmania* è diminuita in tutti e tre i tessuti; tuttavia, ad uno stadio dello studio (6 mesi dopo la prima osservazione) La quantità di parassiti era ancora significativa nella cute ed aumentata nei linfonodi, seppure in misura inferiore. Tali risultati suggeriscono che nel cane la cute può rappresentare un serbatoio di amastigoti quando l'ospite è immunocompetente, in un equilibrio ospite-parassita che somiglia alla fase finale dell'infezione da *Leishmania major* nel modello murino (Belkaid et al. 2000). In questo modello, la fase finale è caratterizzata dalla persistenza del parassita al sito cutaneo dell'inoculo per più di un anno dalla risoluzione delle lesioni cutanee. Alla persistenza di tale quota parassitaria può essere dovuta la stimolazione costante della memoria delle cellule T, che forniscono così protezione dall'infezione. Contrariamente ai numerosi dati esistenti sul modello di leishmaniosi nel topo, non esistono molte informazioni sulle basi immunologiche della leishmaniosi nel cane. E' stato, tuttavia, dimostrato che circa il 50 % dei cani infetti sieropositivi non mostrano alcun segno clinico ma possono infettare le zanzare in una proporzione uguale ai cani sintomatici (Molina et al. 1994, Travi et al. 2001, Courtenay et al. 2002, Chamizo et al. 2005). L'alta quota parassitaria

osservata nella cute del gruppo di cani asintomatici che restano tali per tempi prolungati mette in luce la loro importanza quali ospiti serbatoi.

I risultati ottenuti dall'analisi dei due gruppi di cani conferma i precedenti dati che dimostrano che la cute rappresenta un mezzo affidabile per la diagnosi di leishmaniosi nei cani infetti asintomatici. I dati ottenuti, tuttavia, indicano che la misura della quantità di DNA di *Leishmania* nel linfonodo è necessaria per predire l'evoluzione della malattia, mentre la quantificazione del parassita nel sangue dei cani infetti appare non essere critica per il management clinico dell'infezione.

Studi precedenti hanno mostrato che i cani infetti asintomatici possono sviluppare sia immunità cellulare specifica per la *Leishmania* sia immunità umorale (Pinelli et al. 1994, Cabral et al. 1998). In particolare, è stato osservato che le cellule T dei cani infetti asintomatici producono livelli significativi di IL-2 e TNF in risposta all'antigene *Leishmania* a confronto dei cani infetti sintomatici o di cani sani di controllo (Pinelli et al. 2000, Chamizo et al. 2005).

Le citochine IFN- $\gamma$  e IL-2 sia nell'uomo che nel topo attivano i macrofagi a distruggere il parassita (Liew and O'Donnel 1993). Alti livelli di IFN- $\gamma$  sono stati osservati in pazienti umani oligosintomatici in cui la malattia evolveva a cura spontanea (Carvalho et al. 1992). Accumulo di mRNA di IFN- $\gamma$  è stato anche osservato in cani sia asintomatici che sintomatici infetti da *L. infantum* (Quinnell et al. 2001). Tale accumulo è stato correlato



positivamnete con le risposte umorali (IgG1) ma non con quelle linfoproliferative agli antigeni di *Leishmania* nei cani infetti. In questo studio alti livelli di IL-2 e IFN- $\gamma$  sono stati osservati al tempo della prima osservazione dei cani asintomatici che sono rimasti tali per tutto il periodo dello studio. L'espressione di queste citochine è diminuita con il tempo. Nel sangue del gruppo di cani, invece, che ha sviluppato la malattia IFN- $\gamma$  e IL-2 non erano espressi al tempo della diagnosi, mentre la loro espressione è aumentata alla comparsa dei sintomi clinici. Questi risultati suggeriscono che alti livelli di IFN- $\gamma$  e IL-2 in assenza di sintomi clinici conferiscono al paziente resistenza al progredire della malattia. La risposta Th2 diventa prevalente man mano che i cani progrediscono verso la malattia manifesta. Malgrado ulteriori studi siano necessari per stabilire il ruolo di queste due citochine nella leishmaniosi canina, IFN- $\gamma$  e IL-2 sembrano rappresentare utili marcatori per predire lo sviluppo della malattia nei cani infetti asintomatici.

IL-10 è stata associata alla soppressione della produzione di citochine da parte delle cellule Th1, allo sviluppo di una risposta immunitaria Th2, e alla down regolazione dell'attivazione dei macrofagi leishmanicidi (Mosmann and Moore 1991). Alti livelli di accumulo di IL-10 sono stati osservati nei tessuti di uomo, topo e hamster infetti da *Leishmania*, mentre nel cane esistono dati controversi (Goto and Lindoso 2004). Pinelli et al. (1999a, b) hanno osservato aumentati livelli di IL-10 mRNA in cellule PBMC stimulate

con ConA da cani infetti rispetto ai livelli misurati in cani sani di controllo. Altri autori, invece, non hanno riscontrato tale aumento sia in cani infettati per via naturale (Quinnell et al. 2001), sia infettati sperimentalmente (Santos-Gomes et al. 2002). In questo studio IL-10 è risultata espressa in entrambi i gruppi di cani asintomatici: in un gruppo dopo la comparsa dei sintomi clinici, nell'altro (gruppo senza sintomi) quando la quota di *Leishmania* era più alta. Tali risultati indicano che IL-10 non rappresenta un marcatore di malattia attiva nei cani infetti.

Malgrado sia stata suggerita una correlazione positiva tra l'accumulo di IL-4 e la severità della malattia, il ruolo di questa citochina rimane controverso. IL-4 è stata rilevata in alcuni studi e non in altri. Quinnell et al. (2001) hanno osservato una bassissima quantità di IL-4 nel midollo osseo solo di alcuni cani infetti, ma non di tutti. In questo studio, IL-4 era espressa in entrambi i gruppi di cani asintomatici: nel primo gruppo quando l'infezione progredisce a malattia manifesta e sei mesi dopo la prima osservazione nell'altro gruppo. I livelli di questa citochina sono rimasti alti per tutto il periodo dello studio in entrambi i gruppi di cani.

IL-12 è stata associata con lo sviluppo di cellule Th1 e l'incremento della produzione di IFN- $\gamma$  (Santos-Gomes et al. 2002). IL-18 gioca un ruolo importante nel priming per la produzione di IFN- $\gamma$  da parte delle cellule Th1 (Akira 2000; Quinnell et al. 2001; Chamizo et al. 2005). In questo studio IL-12 era espressa solo nel gruppo di cani infetti asintomatici che progredivano

verso la malattia manifesta al tempo della comparsa dei sintomi, mentre l'espressione di IL-18 era alta in entrambi i gruppi. I livelli di IL-18 sono diminuiti dopo 24 mesi dalla prima osservazione solo nei cani asintomatici che sono rimasti tali per tutto il periodo dello studio. I risultati ottenuti, pertanto, suggeriscono che mentre IL-12 rappresenta un marcatore di malattia attiva, IL-18 potrebbe non essere coinvolto nei processi che inducono la progressione della malattia da asintomatica a sintomatica.

## CONCLUSIONI

L'attendibilità della diagnosi di leishmaniosi basata su metodologie che impiegano la PCR è ormai riconosciuta sia in medicina veterinaria che in medicina umana. L'applicazione della PCR per evidenziare DNA di *Leishmania* in campioni clinici ha dimostrato di risolvere problemi diagnostici dovuti alla bassa sensibilità dell'esame microscopico o al basso valore predittivo della sierologia, i cui risultati possono essere influenzati sia dalla persistenza di anticorpi (falsi positivi) o dall'immunosoppressione (falsi negativi). Attualmente, molti studi suggeriscono che il sangue rappresenta il migliore substrato per la diagnosi di leishmaniosi canina basata su metodologie PCR (Reale et al. 1999; Hu et al. 2000; Ikonomopoulos et al. 2003). Ciò è dovuto alla semplicità del campionamento, che è meno invasivo della raccolta di midollo osseo o di linfonodi, rendendolo pertanto più accettabile da parte dei proprietari. I risultati di questo studio dimostrano che, sebbene il sangue rappresenti un tipo di campione affidabile per la diagnosi basata sull'impiego della PCR, la biopsia cutanea e il linfonodo forniscono i migliori risultati nel follow-up della leishmaniosi canina basata su metodologie PCR. La biopsia cutanea è risultata sensibile allo stesso modo del sangue per la diagnosi della malattia, ma più sensibile del sangue nel follow-up. La biopsia cutanea può essere effettuata facilmente, mentre la raccolta del linfonodo è invasiva e difficoltosa da effettuarsi specialmente nei

cani infetti asintomatici. I risultati ottenuti, pertanto, indicano che la migliore scelta del campione biologico da utilizzare per la diagnosi e il follow-up della leishmaniosi canina basata su metodologie PCR è rappresentata dalla biopsia cutanea.

Una caratteristica della leishmaniosi canina è la presenza di parassiti residui o latenti dopo il trattamento; sono state, pertanto, sviluppate metodiche quantitative per stabilire lo stato dei cani positivi alla PCR e per monitorare la parassitemia nel follow-up dei cani infetti. I risultati ottenuti in questo studio dimostrano che le urine rappresentano un mezzo semplice e non invasivo per il saggio quantitativo della real-time PCR utile per migliorare il management clinico dei cani infetti con sintomi di coinvolgimento renale.

L'impiego della real-time PCR ha anche permesso di stabilire una correlazione tra lo stato clinico, la quantità di parassiti nei tessuti e l'espressione di alcune citochine nei cani infetti. Dal momento che la produzione di citochine sembra giocare un ruolo importante per la risoluzione dell'infezione nei cani infetti asintomatici, i risultati di questo studio suggeriscono che la determinazione quantitativa del DNA di *Leishmania* in campioni di tessuto e la valutazione dei livelli di espressione di alcune citochine mediante real-time PCR possono rappresentare un affidabile tool per predire lo sviluppo della malattia. I risultati descritti possono essere particolarmente utili in aree dove la *Leishmania* è endemica per il trattamento clinico delle forme asintomatiche dell'infezione.

## BIBLIOGRAFIA

**Akira S**, 2000. The role of IL-18 in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 12, 59-63.

**Alexander J, Satoskar Ar, Russel DG**, 1999. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci* 112, 2993-3002.

**Alvar J, Molina R, San Andrés M, Tesouro M, Nieto J, Vitutia M, González F, San Andrés MD, Boggio J, Rodríguez F., Sàinz A, Escacena C**, (1994). Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 88, 371–378.

**Alvar J, Cañavate C, Gutierrez-Solar B et al**, 1997. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* 10, 298-319

**Alvar J**, (2001). Las Leishmaniasis: de la Biología al Control. Salamanca: Laboratorios Intervet S.A.

**Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J**, 2004. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* 57, 1-88.

**Arias JR, Monteiro PS, Zicker F**, 1996. The re-emergence of visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg Infect Dis* 2, 145-146.

**Ashford RW, Desjeux P, de Raadt P**, 1992. Estimation of population at risk of infection and numbers of cases of leishmaniasis. *Parasitol Today* 8, 104-105.

**Ashford DA, Bozza M, Freire M, Miranda JC, Sherlock I, Eulalio C, Lopes U, Fernandes O, Degraive W, Barker RH jr, Badaro R, David JR**, 1995. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 53, 251–255.

**Ashford RW**, 1997. The leishmaniasis as model zoonoses. *Ann Trop Med Parasitol* 91, 693-701.

**Ashford RW**, 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30, 1269-1281.

**Badaro R, Reed SG, Carvalho EM**, 1983. Immunofluorescent antibody test in American visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. *Am J Trop Med Hyg* 32, 480–484.

**Barbieri CL**, 2006. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol* 28, 329-337.

**Belesovic M, Finbloom DS, Meltzer MS, Nacy CA**, 1990. IL-2. A cofactor for induction of activated macrophage resistance to infection. *J Immunol* 145, 831-839.

**Belkaid Y, Mendez S, Lira R, Kadambi N, Milon G, Sacks D**, 2000. A natural model of *Leishmania* major infection reveals a prolonged "silent"

phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J Immunol* 165, 969-977.

**Berman JD, Gallalae JV, Best JM**, 1987. Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. *Biochem Pharmacol* 36, 197-201.

**Berman JD**, 1997. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis* 24, 684-703.

**Berrahal F, Mary C, Roze M, Berenger A, Escoffier K, Lamouroux D, Dunan S**, 1996. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg* 55, 273-277.

**Bonfanti U, Zini E, Minetti E, Zatelli A**, 2004. Free light-chain proteinuria and normal renal histopathology and function in 11 dogs exposed to *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis*, and *Babesia canis*. *J Vet Intern Med* 18, 618-624.

**Bossolasco S, Gaiera G, Olchini D, Gulletta M, Martello L, Bestetti A, Bossi L, Germagnoli L, Lazzarin A, Uberti-Foppa C, Cinque P**, 2003. Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 41, 5080-5084.



**Bourdoiseau G, Bonnefont C, Hoareau E, Boehringer C, Stolle T, Chabanne L**, 1997. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 59, 21-30.

**Brachelente C, Muller N, Doherr MG, Sattler U, Welle M**, 2005. Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T helper-2-biased immune response. *Vet Pathol* 42, 166-175.

**Brajtburg J, Powderly WG, Kobayashi GS, Medoff G**, 1990. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother* 34, 183-188.

**Bretagne S, Durand R, Olivi M, Garin JF, Sulahian A, Rivollet D, Vidaud M, Deniau M**, 2001. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. *Clin Diagn Lab Immunol* 8, 828-831.

**Cabral M, O'Grady JE, Gomes S, Sousa JC, Thomson H, Alexander J**, 1998. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet Parasitol* 76, 173-180.

**Carvalho EM, Barral A, Pedral-Sampaio D, Barral-Netto M, Badaro R, Rocha H, Johnson WD Jr**, 1992. Immunological markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani* *chagasi*. *J Infect Dis* 165, 535-540.

**Cerf BJ, Jones TC, Badaro R, Sanpaio D, Teixeira R, Johnson WDJ,** 1987. Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 156, 1030-1033.

**Chamizo C, Moreno J, Alvar J,** 2005. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 103, 67-75.

**Corlouer JP, Patat JI, Spilbauer JP,** 1983. Case clinique: leishmanioses canine. *Point Veterinaire* 5, 75-76.

**Costa FA, Guerra JL, Silva SM, Klein RP, Mendonca IL, Goto H,** 2000. CD4(+) T cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 33, 1455–1458.

**Costa FA, Goto H, Saldanha LC, Silva SM, Sinhorini IL, Silva TC, Guerra JL,** 2003. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Vet Pathol* 40,677-684.

**Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C,** 2002. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis* 186, 1314-1320.

**Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S,** 2003. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *BMJ* 326, 377-382.

**Dedet JP, Pratlong F**, 2002. Leishmaniasis. In: Cook GC (Ed.), Manson's Tropical Diseases, 21<sup>st</sup> edition, WB Saunders, London, pp. 1339-1364.

**Denerolle P**, 1996. Leishmaniose canine: difficultés du diagnostic et du traitement (125 cas). *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animale de Compagnie* 31, 137-145.

**Deplazes P, Smith NC, Arnold P, Lutz H, Eckert J**, 1995. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol* 17, 451-458.

**Dereure J, Rioux JA, Gallego M, Perieres J, Pratlong F, Mahjou J, Saddiki H**, 1991. *Leishmania tropica* in Morocco: infection in dogs. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 85, 595.

**Dereure J, El-Safi SH, Bucheton B, Boni M, Kheir MM, Davoust B, Pratlong F, Feugier E, Lambert M, Dessein A, Dedet JP**, 2003. Visceral leishmaniasis in eastern Sudan: parasite identification in humans and dogs; host-parasite relationships. *Microbes Infect* 5, 1103-1108.

**Desjeux P**, 1992. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. *World Health Stat Q* 45, 267-275.

**Desjeux P**, 1996. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol* 14, 417-423.

**Desjeux P, Alvar J**, 2003. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol* 97, 3-15.

**Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ**, 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 141, 2407-2412.

**Dutra M, Martinelli R, de Carvalho EM, Rodrigues LE, Brito E, Rocha H**, 1985. Renal involvement in visceral leishmaniasis. *Am J Kidney Dis* 6, 22-27.

**Duxbury RE, Sadun EH**, 1964. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 13, 525–529.

**Dye C, Killick-Kendrick R, Vitutia MM, Walton R, Killick-Kendrick M, Harith AE, Guy MW, Canavate MC, Hasibeder G**, 1992. Epidemiology of canine leishmaniasis: prevalence, incidence and basic reproduction number calculated from a cross-sectional serological survey on the island of Gozo, Malta. *Parasitology* 105, 35-41.

**Dye C, Vidor E, Dereure J**, 1993. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. *Epidemiol Infect* 103, 647-656.

**Elbihari S, Kawasmeh ZA, Al-Naiem A, Al-Atiya S**, 1987. Leishmania infecting man and wild animals in Saudi Arabia. 3. Leishmaniasis in *Psammomys obesus* Cretzschmar in Al-Ahsa oasis. *Trop Med Parasitol* 38, 89-92.

**Ferrer L, Rabanal R, Fondevila D, Domingo M, 1988.** Skin lesions in canine leishmaniasis. *J Small Anim Pract* 29, 381-388.

**Ferrer L, Aisa MJ, Roura X, Portùs M, 1995.** Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Rec* 136, 514-516.

**Fisa R, Gàllego M, Castillejo S, Aisa MJ, Serra T, Riera C, Carrio J, Gàllego J, Portùs M, 1999.** Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain): the example of the Priorat focus. *Vet Parasitol* 83, 87-97.

**Fisa R, Riera C, Gàllego M, Manubens J, Portùs M, 2001.** Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet Parasitol* 99, 105-111.

**Fondevila D, Vilafranca M, Ferrer L, 1997.** Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 56, 319-327.

**Font A, Roura X, Fondevila D, Closa JM, Mascort J, Ferrer L, 1996.** Canine mucosal leishmaniasis. *J Am Animal Hosp Assoc* 32, 131-137.

**Fowell DJ, Bix M, Shinkai K, Lacy D, Locksley RM, 1998.** Disease susceptibility and development of the cytokine repertoire in the murine *Leishmania major* model. *Eur Cytokine Netw* 9, 102-106.

**Francino O, Altet L, Sanchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, Ferrer L, Sanchez A, Roura X, 2006.** Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 137, 214-221.

**Gaeta GB, Gradoni L, Gramiccia M, Martino L, Pizzuti R, Pempinello R, Scotti S, Maisto A**, 1994. Leishmaniosi viscerale in Italia. Epidemiologia, clinica, terapia. *Recenti Progressi di Medicina* 85, 340–347.

**Goto H, Lindoso JAL**, 2004. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 37, 615-623.

**Gradoni L, Maroli M, Gramiccia M, Mancianti F**, 1987. *Leishmania infantum* infection rates in *Phlebotomus perniciosus* fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. *Med Vet Entomol* 1, 339-342.

**Gradoni L**, 1999. Epizootiology of canine leishmaniasis in southern Europe. In: Killick-Kendrick R (ed). Canine leishmaniasis: an update. Hoechst Roussel Vet, Wiesbaden, pp. 32-39.

**Gradoni L**, 2001. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. *Vet Parasitol* 100, 87-103.

**Gradoni L, Ascenzi P**, 2004. Nitric oxide and anti-protozoan chemotherapy. *Parassitologia* 46, 101-103.

**Gramiccia M, Gradoni L**, 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol* 35, 1169-1180.

**Grauer GF, Thomas CB, Eicker SW**, 1985. Estimation of quantitative proteinuria in the dog, using the protein to creatinine ratio from a random, voided sample. *Am J Vet Res* 46, 2116-2119.

**Grimaldi Jr G, Kreutzer RD, Hashiguchi Y, Gomez EA, Mimory T, Tesh RB**, 1992. Description of *Leishmania equatoriensis* sp. n. (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), a new parasite infecting arboreal mammals in Ecuador. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87, 221-228.

**Guarga JL, Moreno J, Lucientes J, Gracia MJ, Peribañez MA, Castello JA**, 2002. Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 88, 13-20.

**Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, Wasunna MK, Bryceson AD**, 2002. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis* 2, 494-501.

**Gumy A, Louis JA, Launois P**, 2004. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. *Int J Parasitol* 34, 433-444.

**Heinzel FP, Rerko RM, Hatam F, Locksley RM**, 1993. Interleukin 2 is necessary for progression of leishmaniasis in susceptible murine hosts. *J Immunol* 150, 3924-3931.

**Hervàs Rodríguez J, Mozos E, Méndez A, Pérez J, Gòmez-Villamandos JC**, 1996. *Leishmania* infection of canine skin fibroblasts in vivo. *Vet Pathol* 33, 469-473.

- Herwaldt BL**, 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354, 1191-1199.
- Hiemenz JW, Walsh TJ**, 1996. Lipid formulations of amphotericin B: recent progress and future directions. *Clin Infect Dis* 22, 133-144.
- Hu XS, Yang WT, Lu HG, Yan HP, Cheng JP, Ma Y, Jin BQ, Zhang T**, 2000. Sequencing a specific kinetoplast DNA fragment of *Leishmania donovani* for polymerase chain reaction amplification in diagnosis of leishmaniasis in bone marrow and blood samples. *J Parasitol* 86, 822-826.
- Ikonomopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG**, 2003. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Vet Parasitol* 113, 99-113.
- Jacobson RL, Eisenberg CL, Svobodova M, Baneth G, et al**, 2003. Outbreak of cutaneous leishmaniasis in northern Israel. *J Infect Dis* 188, 1065-1073.
- Kane MM, Mosser DM**, 2000. Leishmania parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Curr Opin Hematol* 7, 26-31.
- Kemp M, Theander TG, Kharazmi A**, 1996. The contrasting roles of CD4+ T cells in intracellular infections in humans: *Leishmania* as an example. *Immunol Today* 17, 13-16.
- Kramer L, Calvi LE, Grandi G**, (2006). Immunity to *Leishmania infantum* in the dog: resistance and disease. *Vet Res Commun* 30, 53-57.



**Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P**, 2002. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 40, 210-215.

**Lanotte G, Rioux JA, Perieres J, Vollhardt Y**, 1979. Ecologie des leishmaniasés dans le sud de la France. 10. Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. *Ann Parasitol Hum Comp* 54, 277-295.

**Liew FY, O'Donnell CA**, 1993. Immunology of leishmaniasis. *Adv Parasitol* 32, 161-259.

**Lipoldova M, Demant P**, 2006. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nat Rev Genet* 7, 294-305.

**Lopez R, Lucena R, Novales M, Ginel PJ, Martin E, Molleda JM**, 1996. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. *Zentralblatt Vetmed Reihe B* 43, 469-474.

**Lucena R, Molleda JM, Ginel PJ, Novales M, Martín E, López R**, 1994. Third component of complement serum levels in dogs with leishmaniasis. *Zentralblatt von Veterinärmedizin* 41, 48-52.

**Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Della Morte R, Cringoli G, Staiano N, Gravino AE**, 2004. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol* 125, 251-262.

**Manna L, Reale S, Viola E, Vitale F, Foglia Manzillo V, Pavone LM, Caracappa S, Gravino AE**, 2006. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Vet Parasitol*, in press.

**Martinez-Moreno A, Moreno T, Martinez-Moreno FJ, Acosta I, Hernandez S**, 1995. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 48, 209-220.

**Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H**, 2004. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol* 42, 5249-5255.

**Mathis A, Deplazes P**, 1995. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. *J Clin Microbiol* 33, 1145–1149.

**Mendoza-Leon A, Luis L, Fernandes O, Cupolillo E, Garcia L**, 2002. Molecular markers for species identification in the *Leishmania* subgenus *Viannia*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96, S65-S70.

**Mohebbi M, Hajjarian H, Hamzavi Y, Mobedi I, Arshi S, Zarei Z, Akhoundi B, Naeini KM, Avizeh R, Fakhar M**, 2005. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. *Vet Parasitol* 129, 243-251.

**Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andres M, Gonzalez F, Castillo JA, Lucientes J, Alvar J**, 1994. Infectivity of dogs naturally infected with

*Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88, 491-493.

**Moreno J, Alvar J**, 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitology* 18, 399-405.

**Mosmann TR, Moore KW**, 1991. The role of IL-10 in cross-regulation of Th1 and Th2 responses. *Immunol Today* 12, 49-53.

**Muller N, Zimmermann V, Forster U, Bienz M, Gottstein B, Welle M**, 2003. PCR-based detection of canine *Leishmania* infections in formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsies: elaboration of a protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction. *Vet Parasitol* 114, 223-229.

**Neal RA, Murphy AG, Olliaro P, Croft SL**, 1994. Aminosidine ointments for the treatment of experimental cutaneous leishmaniasis. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 88, 223-225.

**Nicolas L, Prina E, Lang T, Milon G**, 2002. Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. *J Clin Microbiol* 40, 1666-1669.

**Nieto CG, Navarrete I, Habela MA, Serrano F, Redondo E**, 1992. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol* 45, 33-47.

**Palacio J, Liste F, Gascon M**, 1995. Urinary protein/creatinine ratio in the evaluation of renal failure in canine leishmaniasis. *Vet Rec* 137, 567-568.

**Persechino A, Oliva G**, 1986. Autoimmunity associated with leishmaniasis in dogs. *Acta Medica Veterinaria* 32, 117–124.

**Peters W, Elbihari S, Evans DA**, (1986). *Leishmania* infecting man and wild animals in Saudi Arabia. 2. *Leishmania arabica* n. sp. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 80, 497–502.

**Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenhaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenber J**, 1994. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun* 62, 229-235.

**Pinelli E, Gonzalo RM, Boog CJP, Rutten VPMG, Gebhard D, del Real G, Ruitenber EJ**, 1995. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. *Eur J Immunol* 25, 1594-1600.

**Pinelli E, Rutten VP, Bruysters M, Moore PF, Ruitenber EJ**, 1999. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. *Infect Immun* 67, 237-43.

**Pinelli E, van der Kaaij SY, Slappendel R, Fragio C, Ruitenber EJ, Bernadina W, Rutten VP**, 1999a. Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 69, 121–126.

**Pinelli E, van der Kaaij SY, Broeren CP, Ruitenberg EJ, Rutten VP,** 1999b. Measurement of dog cytokines by reverse transcription-quantitative competitive polymerase chain reaction. *Immunogenetics* 49, 696–699.

**Pinelli E, Gebhard D, Mommaas AM, van Hoeij M, Langermans JA, Ruitenberg EJ, Rutten VP,** 2000. Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-Leishmanial activity. *Vet Parasitol* 92, 181–189.

**Poli A, Abramo F, Mancianti F, Nigro M, Pieri S, Bionda A,** 1991. Renal involvement in canine leishmaniasis. A light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. *Nephron* 57, 444-452.

**Poot J, Rogers ME, Bates PA, Vermeulen A,** 2005. Detailed analysis of an experimental challenge model for *Leishmania infantum* (JPC strain) in dogs. *Vet Parasitol* 130, 41-53.

**Pozio E, Gradoni L, Bettini S, Gramiccia M,** 1981. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): (VI) canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). *Acta Trop* 38, 383-393.

**Pumarola M, Brevik L, Badiola J, Vargas A, Domingo M, Ferrer L,** 1991. Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. *J Comp Pathol* 105, 279–286.

**Quinnell RJ, Courtenay O, Davidson S, Garcez L, Lambson B, Ramos P, Shaw JJ, Shaw MA, Dye C,** 2001. Detection of *Leishmania*

*infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology* 122, 253-261.

**Reale S, Maxia L, Vitale F, Glorioso S, Caracappa S, Vesco G, 1999.** Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *J Clin Microbiol* 37, 2931-2935.

**Reiner SL, Locksley RM, 1995.** The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Ann Rev Immunol* 13, 151-177.

**Reithinger R, Lambson BE, Barker DC, Davies CR, 2000.** Use of PCR to detect *Leishmania* (*Viannia*) spp. in dog blood and bone marrow. *J Clin Microbiol* 38, 748-751.

**Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR, 2002.** Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J Clin Microbiol* 40, 2352-2356.

**Reithinger R, Canales Espinoza J, Courtenay O, Davies CR, 2003.** Evaluation of PCR as a diagnostic mass-screening tool to detect *Leishmania* (*Viannia*) spp. in domestic dogs (*Canis familiaris*). *J Clin Microbiol* 41, 1486-1493.

**Rhalem A, Sahibi H, Lasri S, Jaffe CL, 1999.** Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. *Vet Immunol Immunopathol* 71, 69-76.

**Rioux JA, Killick-Kendrick R, Leaney AJ, Turner DP, Bailly M, Young CJ**, 1979. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 11. La leishmaniose viscerale canine: succes de la transmission experimentale chien–phlebotome–chien par la piqure de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir 1921. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* 54, 401–407.

**Roberts LS, Janovy J** (Eds), 1995. Foundations of Parasitology. 5<sup>th</sup> ed., pp. 68-77. Brown/McGraw-Hill, Dubuque, IA

**Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF**, 1990. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol* 71, 267–275.

**Rogers KA, DeKrey GK, Mbow ML, Gillespie RD, Brodskyn CI, Titus RG**, 2002. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiol Lett* 209, 1-7.

**Rolao N, Cortes S, Rodrigues OR, Campino L**, 2004. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. *J Parasitol* 90, 1150-1154.

**Rose K, Curtis J, Baldwin T, Mathis A, Kumar B, Sakthianandeswaren A, Spurk T, Low Choy J, Handman E**, 2004. Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos: isolation and characterisation of the causative organisms. *Int J Parasitol* 34, 655-664.

**Roura X, Sanchez A, Ferrer L**, 1999. Diagnosis of canine leishmaniosis using a PCR technique. *Vet Rec* 144, 262-264.

**Sacks D, Noben-Trauth N**, 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2, 845-858.

**Salgado Filho N, Ferreira TM, Costa JM**, 2003. Involvement of the renal function in patients with visceral leishmaniasis (kala-azar). *Rev Soc Bras Med Trop* 36, 217-221.

**Santos-Gomes GM, Rosa R, Leandro C, Cortes S, Romao P, Silveira H**, 2002. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol* 88, 21-30.

**Schonian G, Schweynoch C, Zlateva K, Oskam L, Kroon N, Graser Y, Presber W**, 1996. Identification and determination of the relationships of species and strains within the genus *Leishmania* using single primers in the polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 77, 19-29.

**Schulz A, Mellenthin K, Schonian G, Fleischer B, Drosten C**, 2003. Detection, differentiation and quantitation of pathogenic *Leishmania* organisms by fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 41, 1529-1535.

**Seaman J, Mercer AJ, Sondorp E**, 1996. The epidemic of visceral leishmaniasis in western upper Nile, southern Sudan: course and impact from 1984 to 1994. *Int J Epidemiol* 25, 862-871.



**Seder RA, Paul WE**, 1994. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ cells. *Ann Rev Immunol* 12, 635-673.

**Semiao-Santos SJ, Harith AE, Ferreira E, Pires CA, Sousa C, Gusmao R**, 1995. Evora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. *Parasitol Res* 81, 235–239.

**Sideris V, Papadopoulou G, Dotsika E, Karagouni E**, 1999. Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. *Eur J Epidemiol* 15, 271–276.

**Silva ES, Gontijo CMF, Pirmez C, Fernandes O, Brazil RP**, 2001. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 65, 896–898.

**Singh B**, 1997. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *Int J Parasitol* 27, 1135-1145.

**Slappendel RJ**, 1988. Canine leishmaniasis. *Vet Q* 10, 101-117.

**Slappendel RJ, Teske E**, 1997. The effect intravenous or subcutaneous administration of meglumine antimoniate (Glucantime) in dogs with leishmaniasis. A randomized clinical trial. *Vet Q* 19, 10-13.

**Slappendel RJ, Ferrer L**, 1998. Leishmaniasis. In: Greece, C.E. (ed.), *Infectious diseases of the dog and the cat*, 2<sup>nd</sup> ed. Saunders, Philadelphia, pp. 450-458.

**Solano-Gallego L, Llul J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J, Ferrel L**, 2000. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol* 90, 37-45.

**Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L**, 2001. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol* 39, 560-563.

**Solano-Gallego L, Rodriguez A, Iniesta L, Arboix M, Portus M, Alberola J**, 2003. Detection of anti-*Leishmania* immunoglobulin G antibodies in urine specimens of dogs with leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 10, 849-855.

**Solano-Gallego L, Fernandez-Bellon H, Morell P, Fondevila D, Alberola J, Ramis A, Ferrer L**, 2004. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *J Comp Pathol* 130, 7-12.

**Stobie L, Gurunathan S, Prussin C, Sacks DL, Glaichenhaus N, Wu C-Y, Seder RA**, 2000. The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 8427-8432.

**Thakur CP**, 2000. Socio-economic of visceral leishmaniasis in Bihar (India). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94, 156-157.

**Tobie EJ, Von Brand T, Mehelman B**, 1950. Cultural and physiological observations on *Trypanosoma rhodiense* and *Trypanosoma gambiense*. *J Parasitol* 36, 48-54.

**Travi BL, Tabares CJ, Cadena H, Ferro C, Osorio Y**, 2001. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *Am J Trop Med Hyg* 64, 119-124.

**Valladares JE, Alberola J, Esteban M, Arboix M**, 1996. Disposition of antimony after the administration of N-methylglucamine antimoniate to dogs. *Vet Rec* 138, 181-183.

**Vexenat AC, Santana JM, Teixeira ARL**, 1996. Cross-reactivity of antibodies of human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania (Leishmania) chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 38, 177-185.

**Vianna VL, Takiya CM, de Brito-Gitirana L**, 2002. Histopathologic analysis of hamster hepatocytes submitted to experimental infection with *Leishmania donovani*. *Parasitol Res* 88, 829–836.

**Vinuelas J, Garcia-Alonso M, Ferrando L, Navarrete I, Molano I, Miron C, Carcelen J, Alonso C, Nieto CG**, 2001. Meningeal leishmaniasis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. *Vet Parasitol* 101, 23–27.

**Vitale F, Reale S, Vitale M, Petrotta E, Torina A, Caracappa S,** 2004. TaqMan-based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. *Ann NY Acad Sci* 1026, 139-143.

**WHO,** 1990. Control of the Leishmaniases. Geneva: World Health Organization, Technical Report Series, No. 793.

**WHO,** 2001. WHO information by topics or disease:  
<http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>

**Wortmann G, Hochberg L, Houg HH, Sweeney C, Zapor M, Aronson N, Weina P, Ockenhouse CF,** 2005. Rapid identification of *Leishmania* complexes by a real-time PCR assay. *Am J Trop Med Hyg* 73, 999-1004.